

# **MICROVASCULARIZAÇÃO ARTERIAL DA CÓCLEA**

**MARIA DE ASSUNÇÃO COSTA CAMISÃO SOARES DE GOYRI O'NEILL**

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Medicina  
na Especialidade em Cirurgia e Morfologia Normal  
na Faculdade de Ciências Médicas**

**Março, 2015**

# **MICROVASCULARIZAÇÃO ARTERIAL DA CÓCLEA**

**Nome Do Autor: Maria de Assunção Costa Camisão Soares de Goyri O'Neill**

**Orientador: Professor Doutor Mário Orlando de Matos Bernardo,  
professor catedrático jubilado**

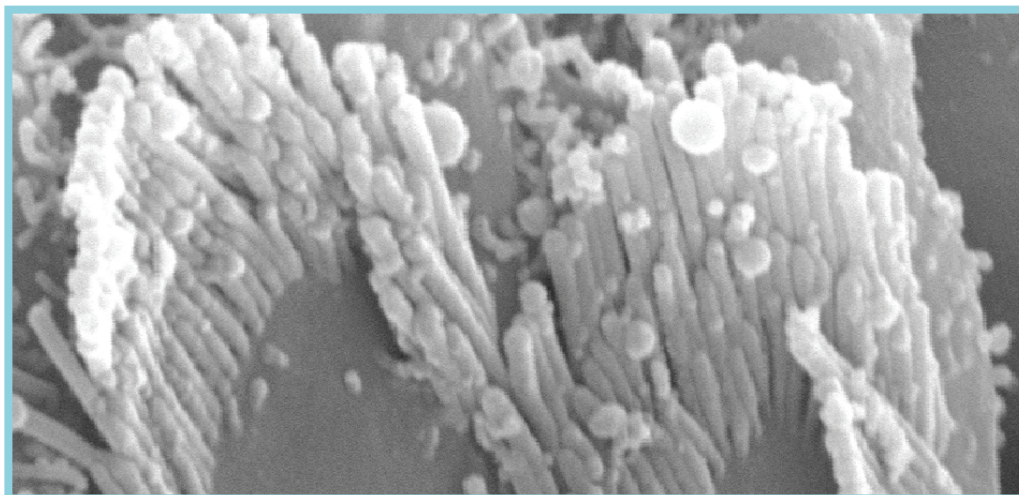
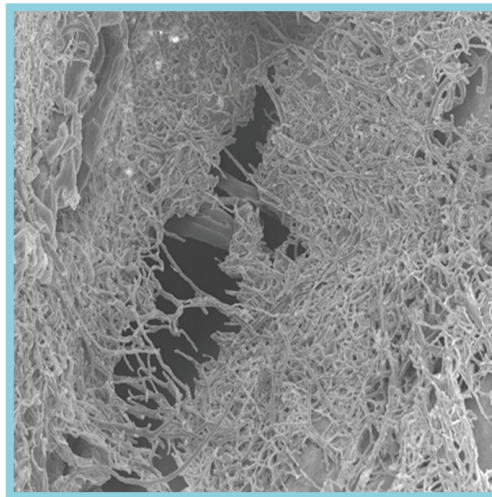
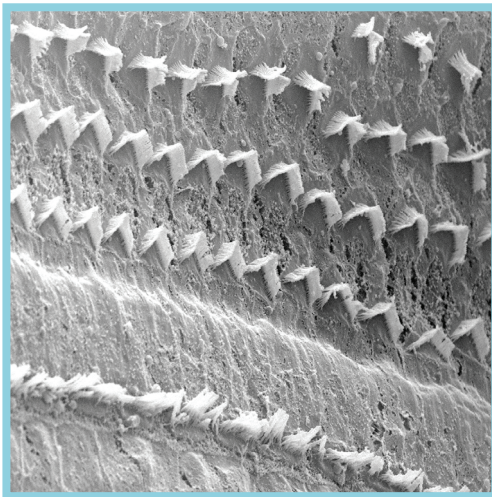
**Co-orientador: Professor Doutor José António Rebocho Esperança Pina;  
professor catedrático jubilado**

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Medicina  
na Especialidade em Cirurgia e Morfologia Normal**

**Março, 2015**

MARIA DE ASSUNÇÃO COSTA CAMISÃO SOARES  
DE GOYRI O'NEILL

# MICROVASCULARIZAÇÃO ARTERIAL DA CÓCLEA



LISBOA 2015

Este texto não foi escrito ao abrigo do novo Acordo Ortográfico.



*Aos meus Afectos*

Paro à beira de mim e me debruço...  
Abismo... E nesse abismo o Universo,  
Com seu tempo e seu 'spaço, é um astro, e nesse  
Alguns há, outros universos, outras  
Formas do Ser com outros tempos, 'spaços  
E outras vidas diversas desta vida...

FERNANDO PESSOA

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>8</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1. Nota Histórica — Representação simbólica .....	14
1.2. Biologia do Desenvolvimento do Ouvido .....	18
1.2.1. Ouvido Externo .....	18
1.2.2. Ouvido Médio .....	19
1.2.3. Ouvido Interno .....	20
1.3. ANATOMIA E FISIOLOGIA DA CÓCLEA .....	22
1.3.1. O Labirinto Ósseo .....	22
1.3.2. Labirinto Membranoso .....	23
1.3.2.1. Parede superior ou vestibular .....	24
1.3.2.2. Parede externa .....	24
1.3.2.3. Parede inferior ou coclear .....	24
1.3.2.3.1. Órgão Espiral de Corti .....	24
1.3.2.3.2. Células Ciliadas .....	25
1.4. Vascularização da Cóclea — O estado da arte .....	28
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS DE ESTUDO .....</b>	<b>32</b>
2.1. Material de estudo .....	33
2.2. Metodologia experimental .....	34
2.2.1. Legislação para fins experimentais .....	34
2.2.2. Protocolo experimental .....	37
2.2.2.1. Alojamento no biotério .....	37
2.2.2.2. Protocolo anestésico .....	37
2.2.2.3. Protocolo cirúrgico .....	38

2.3. Técnicas de estudo .....	39
2.3.1. Técnica de Injecção-Microdissecção .....	39
2.3.2. Técnica de Injecção-Diafanização .....	41
2.3.3 Técnica Histológica .....	43
2.3.4. Técnica de Microscopia Electrónica de Varrimento em Moldes Vasculares .....	45
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
3.1. Labirinto Ósseo Anterior — Cóclea .....	48
3.1.1. Parede Externa da Cóclea .....	48
3.1.2. Lâmina Espiral Óssea .....	48
3.1.3. Espira Basal da Cóclea .....	53
3.2. Labirinto Membranoso Anterior .....	54
3.2.1. Canal Coclear ou Ducto Coclear .....	55
3.2.1.1. Lâmina Basilar .....	56
3.2.1.2. Órgão Espiral de Corti .....	56
3.2.1.2.1 Células Ciliadas Internas .....	57
3.2.1.2.2 Células Ciliadas Externas .....	58
3.2.1.3. Lâmina Vestibular ou de Reissner .....	60
3.2.2. Gânglio Espiral de Corti .....	62
3.3. A Cóclea e a Origem da Sua Vascularização Arterial .....	64
3.3.1. Vascularização arterial da parede interna da Cóclea Membranosa .....	64
3.3.2. Artéria Modiolar Espiralada .....	66
3.3.2.1. Artéria Modiolar Espiralada e os seus ramos colaterais .....	69
3.3.2.1.1. Arteriolas Radiárias Internas .....	72
3.3.2.1.1.1. Arteriolas do Gânglio Espiral .....	75
3.3.2.1.1.2. Arteriolas da Rede Espiral Interna .....	77
3.3.2.1.1.3. Glomérulos de Schwalbe .....	78
3.3.2.1.1.4. Arteriola da Lâmina Basilar .....	79
3.3.2.1.2. Arteriolas Radiárias Externas .....	81
3.3.2.1.2.1. Rede Vascular Supra-Estriada .....	84
3.3.2.2. Artéria Modiolar Espiralada e os seus ramos terminais .....	85
3.3.2.2.1. Arteriolas do Ápice da Cóclea .....	85
3.3.3. Vascularização Arterial da parede externa da Cóclea Membranosa ....	86
3.3.3.1. Arteriolas do Ligamento Espiral .....	86

3.3.3.2. Rede capilar da Estria Vascular .....	88
3.3.4. Vascularização da parede externa da Espira Basal .....	91
<b>4. ESTUDO MORFOMÉTRICO DA MICROVASCULARIZAÇÃO</b>	
<b>ARTERIAL DA CÓCLEA .....</b>	<b>97</b>
4.1. Dados utilizados .....	98
4.2. Glossário .....	98
4.3. Parede interna da Cóclea .....	99
4.3.1. Morfometria das Arteriolas Radiárias Internas .....	99
4.3.1.1. Morfometria das arteriolas da Rede Espiral Interna .....	100
4.3.1.2. Morfometria dos capilares da Rede Espiral Interna .....	101
4.3.1.3. Morfometria dos capilares da Rede Glomerular de Schwalbe ...	103
4.4. Parede externa da Cóclea .....	104
4.4.1. Morfometria das arteriolas da parede externa da Espira Basal .....	104
4.4.2. Morfometria dos capilares do Ligamento Espiral e Estria Vascular ....	104
4.5. Estatísticas Descritivas .....	105
4.6. Testes Paramétricos .....	105
4.7. Testes Não-Paramétricos .....	108
4.8. Conclusão .....	110
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>112</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>125</b>
<b>7. RESUMO .....</b>	<b>128</b>
<b>8. ABSTRACT .....</b>	<b>132</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>137</b>

# AGRADECIMENTOS

A minha gratidão para os orientadores, duas grandes figuras da Medicina e Investigação Científica Portuguesa, o Professor Doutor José António Esperança Pina e o Professor Doutor Mário Orlando de Matos Bernardo, que pelo seu exemplo de perseverança, tenacidade e grande rigor científico constituem exemplo de gerações, e que sempre me incentivaram e criticaram elevando o seu ensino e sugestões a um patamar de grande rigor.

Gostaria também de agradecer penhoradamente a confiança que em mim depositaram ao aceitar ser meus Orientadores de tese.

Ao Professor Doutor Goyri O'Neill, actual director do Departamento de Anatomia quero agradecer o exemplo de combatividade e perseverança e toda a ajuda na realização deste estudo, nomeadamente nos detalhes técnicos de toda a casuística.

Ao Professor Dr. Diogo Pais quero agradecer todo o apoio que sempre me deu sob o ponto de vista científico, e enquanto Presidente da Comissão de Ética e manifestar-lhe como tem sido enriquecedor trabalhar sob a sua orientação.

Ao Professor Dr. Pedro Escada, meu actual director de Serviço de Otorrinolaringologia, agradeço o seu apoio incondicional e o seu exemplo na procura de sempre maior rigor na investigação Clínica.

Ao Professor Dr. Carlos Godinho, Professora Dra Alexandra Pires, Professor Dr. Guedes da Silva e ao Dr. Freire de Andrade, as valiosas sugestões, camaradagem e amizade.

A todos os assistentes e monitores do departamento de Anatomia com um agradecimento muito especial ao Dr. Luís Albuquerque de Mascarenhas, gostaria de manifestar quão grato tem sido trabalhar com todos.

Ao Professor Doutor Rui Penha o ter incentivado na escolha do tema.

Aos colegas do Serviço de Otorrinolaringologia e em especial ao Dr. Jorge Domingues, quero agradecer a sua camaradagem e o profissionalismo que é uma constante do quotidiano.

Ao Professor Dr. José Luís Guedes, companheiro de algumas sessões de cirurgia experimental, o seu rigor e ajuda.

Gostaria de agradecer ao Sr. Carlos Lopes e ao Sr. Octávio Chaveiro a disponibilidade ilimitada subjacente à realização deste trabalho.

À Sra. D. Teresa de Sousa agradeço a colaboração e amizade.

Aos Professores, Colegas e demais funcionários da Faculdade e do departamento que directa ou indirectamente manifestaram o seu apoio e amizade, o meu obrigada.

Aos meus alunos, agradeço a constante motivação e o interesse na aquisição de conhecimentos

À Dra. Susana Sarmento agradeço a competência e amizade com que realizou todo o estudo estatístico.

Às Dra. Ana Penha e Dra. Shaiza Jethra agradeço o incentivo.

À Dra. Ana Moreira o profissionalismo na composição gráfica.



Aos meus filhos, Patrícia, Margarida, Maria João e João Miguel agradeço o seu apoio, o seu incentivo e a sua dedicação, por vezes com sacrifício dos seus momentos de juventude e lazer.

A meus Pais agradeço o Exemplo e os princípios que me inculcaram. Ao Artur, ao Hugo, ao Pedro e ao Sébastien o apoio e a incondicionalidade.

À Carolina, à Sofia, à Matilde e à Mariana a alegria que trouxeram à minha vida.

A todos os meus Amigos a amizade e incondicionalidade.

Não é possível enumerar todos os que com uma palavra de estímulo, de confiança ou até com um sorriso, contribuíram para esta tese.

A TODOS O MEU MUITO OBRIGADA!

# 1. INTRODUÇÃO

A função coclear está intimamente dependente da microvascularização do ouvido interno. Como tal, o conhecimento exacto da angiomorfologia normal é de importância crucial, não só para a interpretação fisiopatológica das alterações do fluxo sanguíneo coclear, mas também para a compreensão dos vários tipos de hipoacúsia humana.

A impossibilidade de estudar o fluxo sanguíneo coclear por técnicas *in vivo*, não destrutivas da delicada morfologia coclear, limita a evidência do verdadeiro papel da microvascularização do ouvido interno na função da cóclea, nomeadamente no que respeita à audição. Para o estudo da angiomorfologia, acreditamos na necessidade de criar, no modelo experimental, padrões vasculares normais. Os dados obtidos servirão de controlo do normal em futuros estudos experimentais (químicos, físicos e metabólicos). A mimetização destas situações no animal experimental permite melhor caracterização das alterações da microvascularização arterial no Homem, e também melhor interpretação das alterações vasculares na hipoacúsia.

A hipoacúsia, ou diminuição dos limiares auditivos por lesão coclear, pode dever-se a alteração das estruturas das paredes interna ou externa da cóclea, com consequente alteração microvascular a esse nível. A caracterização dos vários tipos de hipoacúsia por lesão coclear foi realizada por Schuknecht, em 1969<sup>[1-3]</sup>, ao estudar a fisiopatologia subjacente à presbiacúsia com base no perfil audiológico dos pacientes, que depois correlacionou com as várias alterações na morfologia coclear, classificação esta posteriormente revista por Lee em 2013<sup>[5]</sup>.

A **presbiacúsia de tipo sensorial** está intimamente relacionada com a degenerescência do órgão espiral de Corti e lesão das células ciliadas externas ao nível da base da cóclea. Tendo em mente a tonotopia coclear, com localização dos sons agudos ao nível da base da cóclea, facilmente se explica que este tipo de lesão se caracteriza por um padrão audiométrico com perda nas altas frequências.

A **presbiacúsia de tipo neural** caracteriza-se por perda neuronal, nomeadamente de aferências neuronais, com tradução audiométrica numa curva gradualmente descendente, com atingimento importante da discriminação auditiva. Otte e colaboradores<sup>[6]</sup>, em estudos realizados, evidenciaram cerca de 5 a 10% de perda neuronal por cada dez anos de vida na espécie humana.

A **presbiacúsia de tipo metabólico** resulta da atrofia da estria vascular, que conduz à alteração do potencial da endolinfa, por diminuição das células da estria vascular com consequente alteração do mecanismo de reciclagem de K<sup>+</sup>. Esta hipoacúsia acompanha-se ainda de alteração da morfologia do ligamento espiral e traduz-se, em termos audiométricos, por uma curva aplanada com perdas em todas as frequências. Na surdez genética de transmissão autossômica dominante de tipo DFNA9, a surdez é também de tipo metabólico caracterizada por atrofia de estria vascular e do ligamento espiral.

A **presbiacúsia de condução coclear** traduz-se por alteração na condução coclear, causada por rigidez na base da cóclea e consequente lesão apical, o que leva a uma curva audiométrica com atingimento sobretudo das baixas frequências ou seja dos sons graves.

A **presbiacúsia de tipo misto** caracteriza-se por padrão audiológico misto verificando-se atingimento das altas frequências e dos sons agudos, devido à perda de células ciliadas externas, sobretudo na espira basal; perda de discriminação, devida à perda severa de população neuronal coclear; perda em todas as frequências, devida à diminuição de células na estria vascular e no ligamento espiral; e atingimento das baixas frequências, devido à lesão nas espiras apicais.

Tendo em mente a tonotopia coclear, estando caracterizados todos os tipos de hipoacúsia sensorioneural, inquirimo-nos em que medida é que a microvascularização coclear, considerando não só a cóclea no seu conjunto, mas também as diferentes redes microvasculares, das paredes interna e externa da cóclea, contribui para este tipo de alterações.

Daí a importância do estudo da microvascularização coclear, não só ao nível da rede microvascular, dependente da artéria modiolar espiralada em íntima relação com as células do gânglio espiral, mas também ao nível da parede externa da cóclea com particular destaque para a microvascularização da estria vascular, do ligamento espiral e da espira basal da cóclea, com estudo morfométrico dos respectivos calibres vasculares.

## 1.1. NOTA HISTÓRICA — REPRESENTAÇÃO SIMBÓLICA

### EGIPTO — A ORELHA DIVINA

Irei iniciar esta exposição com uma representação do sentido da audição, numa magnífica estela, encontrada no interior do recinto do templo de Hathor, Egipto, XIX-XX dinastia, Novo Reino.

Nela, o artesão Bai, de Deir el Medinesh, Praça da Verdade, dirige-se directamente a Amon, «o que escuta as orações», fazendo representar este facto simbólico por três pares de orelhas, aliadas a uma atitude de prece. Em baixo, o deus Amon está representado duas vezes sob a forma de carneiro sagrado (FIG. 1).

Esta estela simboliza o hino sagrado: «O deus acerca-se de quem o chama» ou «O deus que está sentado vem a quem o chama. Esplêndido em aparência, rico em orelhas» (Zabern, 1987)<sup>[7]</sup>.



FIG.1 Estela do Artesão Bei — Museu Egípcio do Cairo

No antigo Egito, o ouvido estava associado a três funções principais: a audição como sentido, como mediação integrada na prece, representando o fazer-se ouvir pelos deuses e à função decorativa, como suporte de ornamento (Zabern, 1987; Zabern, 2005)<sup>[7][8]</sup>.

A audição encontra-se bem documentada, quando em figuras de cantores e em outras atividades, os protagonistas se apresentam com as mãos atrás do pavilhão auricular, ilustrando o acto de ouvir (Mudry, 2006)<sup>[9]</sup>.

Os que desejavam ser ouvidos pelos deuses escreviam mensagens ou agradecimentos, sempre acompanhados do seu próprio nome, em peças em que aparecia inscrita a «orelha divina».

Junto a Karnak encontraram-se cerca de 17000 peças, depositadas por gente humilde que assim queria fazer ouvir as suas preces.

Nos muros, inúmeros vestígios de orelhas sagradas atestam o desejo de comunicar com os deuses.



FIG. 2 Pormenor de um friso no recinto de Amun Re (Wikipédia)

É curioso o modo como o pavilhão auricular era representado em hieroglifos.

Os hieróglifos, do grego *hieros* (sagrado) e *glipho* (esculpir ou gravar) eram denominados de «palavras de Deus», sendo a sua invenção atribuída a Toty, deus da sabedoria, e a escrita a Seshat, deusa da escrita.

Os hieróglifos utilizavam-se sobretudo nas obras monumentais, gravados para a Eternidade como textos em pedra (FIG. 2). A representação em hieróglifos do pavilhão auricular, encontra-se representada inicialmente, sob a forma de pavilhão auricular de vaca, em homenagem à deusa Hathor.

Hathor, a deusa da alegria, da fertilidade, da música e da dança, é inicialmente representada sob a forma de vaca. Surge representada em capela própria e está associada a numerosos papiros, (Zabern, 2005)<sup>[8]</sup> (FIG. 3).



**FIG. 3** A capela da vaca sagrada de Hathor — Museu Egípcio do Cairo-sala 12 r/c 18.<sup>a</sup> dinastia, fim do reinado de Thoutmosis III (Zabern, 1987)<sup>[7]</sup> (in Musée Égyptien du Cairo-catalogue officiel)



**FIG. 4** A deusa Hathor — Coluna de Hathor do Templo de Dendera, ruínas de Tentyra (Carpiceci, 2000)<sup>[10]</sup>

Representa o regresso da fertilidade às regiões áridas do Egipto (Neville E, 1907)<sup>[11]</sup>. Quando sob a forma de vaca, a deusa Hathor surge com todos os seus símbolos, o disco solar, a coroa e o ceptro em forma de serpente.

Por vezes, Hathor, a deusa da alegria, da fertilidade, da música e da dança, surge sob a forma de uma face humana associada a pavilhão auricular de vaca (FIG. 4).

Esta representação é visível ao longo da história do Egipto, em diferentes templos e locais de culto. Inicialmente observada na 1.<sup>a</sup> dinastia, será em Deir el Medineh no templo de Hatshepsut que a sua representação atinge o apogeu (Carpiceci, 2000)<sup>[10]</sup>.

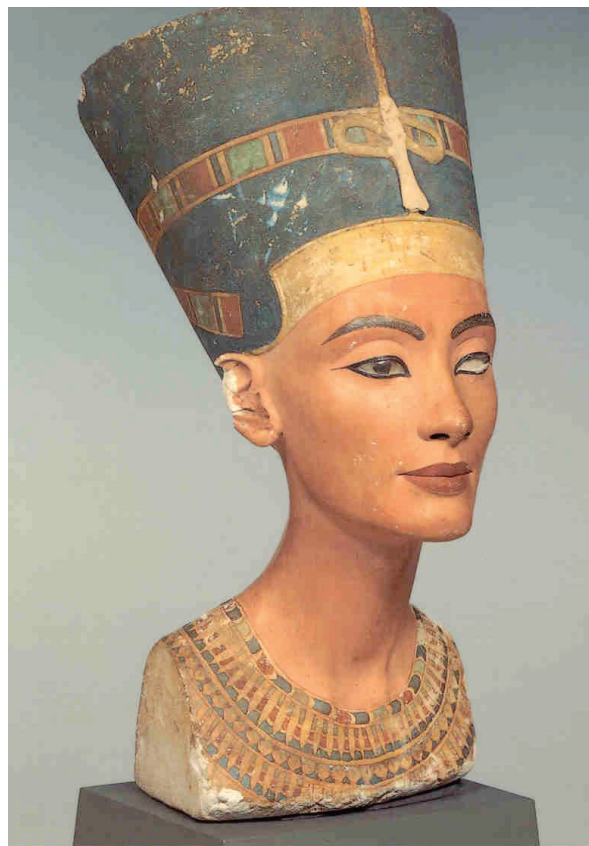
Outra manifestação do ouvido como símbolo de prece e comunicação com os deuses, surge nos hieróglifos dos textos das pirâmides, por exemplo na câmara funerária do rei Horus. Estes, representavam preces e também símbolos, entre eles vários símbolos de orelhas, que ajudariam o rei a ascender aos Céus.



O papiro cirúrgico (Allen, 2006)<sup>[12]</sup> que data de 3000-2500 a.C., inclui descrições de lesão do osso temporal como sequelas de feridas de guerra e o seu efeito na audição e produção de linguagem.

No papiro de Ebers, 1500 a.C., (Allen, 2006)<sup>[12]</sup> um dos capítulos está exclusivamente dedicado a «medicinas para a audição e fracos de ouvido».

As reduzidas dimensões do ouvido interno e o seu difícil acesso cirúrgico, foram em parte responsáveis pela escassa informação sobre o tema.



**FIG. 5** Nefertiti — Museu Egípcio de Berlim

Reportando à função decorativa, Nefertiti (FIG. 5) ideal de beleza e perfeição surge com os lóbulos das orelhas perfurados (Breger, 2006)<sup>[13]</sup>.

Este papel decorativo atribuído aos adornos do ouvido, colocados no lóbulo da orelha, estava aliado no Egito também à função de afastar os espíritos.

## 1.2. BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO DO OUVIDO

### 1.2.1. Ouvido Externo

O pavilhão auricular e o conduto auditivo externo têm a sua origem na extremidade dorsal do 1.º e 2.º arcos branquiais e também na 1.ª fenda branquial, a partir de proliferações mesenquimatosas, cerca de três de cada lado do canal auditivo externo. Estas, designadas por Moldenhauer de *colliculi branchiali externi*, originam zonas bem delimitadas do pavilhão auricular. O trago e o lóbulo da orelha serão dependentes do colliculi 1 e 6, tendo assim uma origem dupla no 1.º e no 2.º arcos branquiais.

O antélice e o antítragos originam-se respectivamente nos *colliculi* 4 e 5.

O hélice origina-se da proliferação e enrolamento dos *colliculi* 2 e 3.

X.H. Wang, (Wang et al., 2009)<sup>[14]</sup> introduzem a noção de proliferações mesenquimatosas profundas e marginais, originando-se assim o pavilhão auricular ou orelha simultaneamente do 1.º arco e do 2.º arco branquiais.

Para Wood-Jones, 1934<sup>[15]</sup>, a formação do hélice depende do enrolamento anti-horário do lábio hioídeo da 1.ª fenda branquial.

O canal auditivo externo deriva da porção dorsal da 1.ª fenda branquial ectoblástica, que ao invaginar-se contacta com a invaginação da 1.ª fenda branquial endoblástica, que forma a caixa do tímpano e a tuba auditiva. No início da 10.ª semana, as células epiteliais do conduto proliferam formando uma placa epitelial junto à caixa do tímpano. A mesoderme que reveste cada uma destas fendas insinua-se entre estas, condicionando a tripla origem embriológica da membrana timpânica; uma camada externa de origem ectoblástica, uma camada média de origem mesoblástica e uma camada interna de origem endoblástica.

O osso timpânico que originará o canal auditivo externo resulta da ossificação membranosa do tecido conjuntivo à volta da membrana do tímpano, de um anel ósseo que tem a sua origem em quatro centros de ossificação distintos (Anson et al., 1955)<sup>[16]</sup>.

O canal auditivo externo ósseo tem uma cronologia de desenvolvimento que se inicia no embrião de nove semanas e que apenas se completa um ano após o nascimento.

### 1.2.2. Ouvido Médio

A caixa do tímpano ou cavidade timpânica, o antro e restantes cavidades mastóideas e a tuba auditiva, têm a sua origem em fenómenos de reabsorção do tecido conjuntivo embrionário, que se completa apenas após o nascimento, com invasão das cavidades do ouvido médio pelo epitélio tubo-timpânico, e com pneumatização das cavidades que se inicia com o nascimento e que prossegue durante a infância.

As paredes ósseas têm uma formação complexa, originando-se por diferentes focos de ossificação membranosa e endocondral em diferentes estruturas constituintes da base do crâneo.

Os ossículos e respectivo aparelho musculo-ligamentoso têm a sua origem no esqueleto dos dois primeiros arcos branquiais e na cápsula ótica.

A membrana do tímpano origina-se na primeira bolsa faríngea.

O canal tubo-timpânico de Kolliker, que irá originar a trompa, origina-se da primeira bolsa endobranquial.

É visível no embrião, no estágio de 14 sómitos, externamente o futuro canal auditivo externo, que tem a sua origem no epiblasto, e internamente a cápsula ótica que tem origem ectoblástica.

No embrião de cinco semanas, a extremidade dorsal do canal tubo-timpânico contacta com o fundo da 1.<sup>a</sup> bolsa ectobranquial, que constituirá o futuro canal auditivo externo, segundo um plano oblíquo, o que explica a obliquidade do tímpano no adulto.

O canal tubo-timpânico relaciona-se com a face externa da vesícula ótica, com a sua porção anterior, formando esta posteriormente a parede interna da caixa.

Os ossículos, inicialmente estruturas extra-timpânicas, são posteriormente envolvidos pela proliferação do canal tubo-timpânico ou cavidade timpânica primária, em direcção cefálica, enviando prolongamentos que se insinuam entre os ossículos, envolvendo-os e englobando-os posteriormente na caixa do tímpano (Anson et al., 1967a; Anson et al., 1967b; Guilford and Anson, 1967)<sup>[17-19]</sup>.

Os ossículos derivam do esqueleto do 1.<sup>o</sup> e 2.<sup>o</sup> arcos branquiais à excepção da platina do estapédio que tem a sua origem na cápsula ótica.

Na porção dorsal da cartilagem do 1.<sup>o</sup> arco branquial surge o esboço cartilágneo da bigorna e na extremidade dorsal da porção ventral da cartilagem do 1.<sup>o</sup> arco branquial ou cartilagem de Meckel, origina-se o esboço do martelo ou maleo.

O esboço do estribo origina-se da cartilagem de Reichert, na porção posterior da cartilagem do 2.º arco, destaca-se desta ao 38.º dia, e relaciona-se com a artéria do 2.º arco ou artéria estapédica a qual posteriormente regride. Forma-se assim, o *annulus stapedialis* cujo bordo interno ao relacionar-se com a parede interna da cápsula ótica, na região da futura janela oval, forma a platina do estribo.

O desenvolvimento do estribo está concluído ao 6.º mês de vida fetal e precocemente adquire as características de fragilidade próprias da senescência.

A bigorna é o primeiro ossículo a ossificar, no início do 6.º mês, altura em que atinge o tamanho que terá no adulto. O martelo tem dupla ossificação membranosa e endocondral.

O músculo do martelo origina-se na mesoderme do 1.º arco branquial e a sua inervação depende do ramo mandibular do nervo do 1.º arco, o trigémeo.

O músculo do estribo que se desenvolve na dependência do mesênquima em relação com a cartilagem de Reichert é innervado pelo nervo do 2.º arco, o facial.

Relativamente às paredes e canais da caixa do tímpano, a sua origem é complexa.

A parede superior da caixa ou *tegmen tympani* origina-se da expansão lateral da cápsula ótica.

A relação da carótida interna e do nervo facial com a cápsula ótica cartilaginosa condiciona respectivamente, o canal carotídeo e o aqueduto de Falópio.

A primeira porção do canal do nervo facial ou aqueduto de Falópio é condicionada pelo trajecto inicial do facial entre o utrículo e a cóclea, a segunda porção, oblíqua para trás e para fora está em relação com a proliferação do canal tubo-timpânico, a terceira porção, vertical, relaciona-se com a parede posterior da caixa.

### 1.2.3. Ouvido Interno

O ouvido interno deriva da cápsula ótica (Costa, 1950; Anson et al., 1955)<sup>[16][20]</sup>, origina-se no chamado primórdio ótico.

A formação do placódio ótico pressupõe a existência de fenómenos em cascata, que dependem também da acção de factores de crescimento, *FGF*, que levam a que a ectoderme primitiva se diferencie no placódio otico e este origine a vesícula ótica.

A cóclea nos mamíferos origina-se no ducto coclear que sofre um enrolamento, contrariamente ao que se passa nas aves, em que se mantém linear.

Existe um ordenamento espacial perfeito em volta de um eixo longitudinal que se traduz numa hierarquia de propriedades distintas na lâmina basilar e nas respectivas células ciliadas ao longo de toda a cóclea condicionando o que, em termos de função, se chama de tonotopia coclear.

No embrião de três semanas, com cerca de 4mm, surge lateralmente ao rombêncefalo a placa ótica. Desenvolve-se como um espessamento da ectoderme na superfície lateral da extremidade cefálica ao nível do IV ventrículo.

Formam-se duas estruturas distintas, o otocisto ventral e o otocisto dorsal. Do otocisto dorsal originam-se os canais semicirculares e as cristas acústicas, do otocisto ventral origina-se a cóclea. A vesícula ótica divide-se formando o utrículo e o sáculo.

O utrículo apresenta três invaginações, perpendiculares entre si, que formam subsequentemente os canais semicirculares, nos quais se diferenciam as estrias acústicas.

A cóclea origina-se da invaginação do sáculo que forma inicialmente o *ducto reuniens*, o qual prolifera formando um canal de três espiras que termina em fundo de saco (Bast, 1946)<sup>[21]</sup>.

Ao 37.º dia de vida embrionária, num embrião com 15 mm, os canais semicirculares ganham alguma individualidade e destacam-se na superfície dorsal do otocisto, encontrando-se já bem desenvolvidos como canais no embrião de 30 mm.

A cóclea surge no embrião como um divertículo inferior do otocisto entre o 36.º e o 38.º dia, entre a 5ª e a 6ª semanas de desenvolvimento embrionário.

A cóclea prolifera e sofre um enrolamento sobre um eixo imaginário até formar, no final do 3.º mês de vida embrionária, duas voltas e três quartos de espira, no que poderá ser uma tradução de interação entre a ectoderme e o mesênquima.

Já no período fetal, às 10 semanas de desenvolvimento, o mesênquima forma a parede labiríntica, e o tecido que o rodeia a cápsula ótica. Esta deprime e forma a fossa acústica que origina a vesícula ótica.

Será por invaginação da vesícula ótica que se forma o ducto endolinfático.

O órgão espiral de Corti forma-se por diferenciação do epitélio do ducto coclear ao terceiro mês de vida intra-uterina.

Já à 8.ª semana de desenvolvimento embrionário é possível distinguir o modíolo e as rampas timpânica e vestibular. Entre ambas desenvolve-se a lâmina espiral óssea e o ducto coclear.

No ducto coclear o epitélio da lâmina basilar modifica-se para dar origem ao órgão espiral de Corti e à membrana tectória.

Pensa-se que o mecanismo de indução celular que leva à formação das células sensoriais leva também à formação das células de sustentação, as células dos pilares de Corti, as células de Deiters, as células de Hensen, as células de Claudius e as células falângicas internas e externas (Testut, 1921)<sup>[22]</sup>.

### 1.3. ANATOMIA E FISILOGIA DA CÓCLEA

#### 1.3.1. O Labirinto Ósseo

A cóclea forma a porção anterior do labirinto.

O seu nome deve-se à sua semelhança com a concha de um caracol.

As cavidades do ouvido interno são rodeadas pelo labirinto ósseo, derivado da cápsula ótica, osso muito denso originado por ossificação endocondral (Davies, 1963)<sup>[23]</sup>.

O labirinto ósseo anterior, ou cóclea, é constituído por uma estrutura tridimensional, que se enrola em volta de um eixo imaginário perpendicular ao eixo petroso, denominado por Breschet de columela, e por Valsalva de modíolo.

À volta do modíolo enrola-se o ducto coclear, ou *canalis spiralis cochlea*, que na espécie humana tem duas voltas e meia de espira, e no cobaio tem três voltas e meia de espira.

Da columela destaca-se uma lâmina óssea, a lâmina espiral óssea ou *lamina spiralis* óssea, que não atinge a parede externa ou lâmina de contornos.

A lâmina espiral óssea apresenta um bordo livre que apresenta dois lábios, na cóclea membranosa, o lábio timpânico que dá inserção à lâmina basilar, e o lábio vestibular que dá inserção à lâmina vestibular ou de Reissner, condicionando em cada uma das espiras, duas rampas, a rampa inferior ou timpânica e a rampa superior ou vestibular. Estas, comunicam no ápice coclear, pelo *rostrum* ou *hamulus da lamina spiralis*, ao nível do qual as rampas timpânica e vestibular comunicam entre si pelo helicotrema (Avan and Bonfils, 1991; Avan et al., 1991a; Avan et al., 1991b)<sup>[24-26]</sup>.

A porção basal da cóclea corresponde à porção basal da rampa coclear, formando a cavidade subvestibular onde se abrem a janela redonda e o aqueduto da cóclea.

O aqueduto coclear dirige-se para trás e para baixo e termina na fosseta piramidal, abaixo do meato auditivo interno, no espaço subaracnoideu.

### 1.3.2. Labirinto Membranoso

O labirinto membranoso, ducto coclear ou *ductus cochlearis*, está separado do labirinto ósseo pelo espaço perilinfático, pleno de perilinfa. No seu interior situa-se a endolinfa. A cóclea membranosa é representada no homem e nos vertebrados superiores por um longo canal, que se desenvolve no interior da cóclea óssea.

Este canal, o ducto coclear inicia-se no pavimento do vestíbulo por uma extremidade em fundo de saco e comunica com o sáculo pelo *canalis reuniens* de Hansen.

A partir do pavimento do vestíbulo lança-se na cóclea óssea percorre-a em toda a sua extensão e termina em fundo de saco.

No seu trajecto no interior da cóclea óssea, o ducto coclear dispõe-se ao longo do bordo externo da lâmina espiral óssea e prolonga este bordo livre até a lâmina de contornos separando a rampa timpânica da rampa vestibular.

O ducto coclear apresenta ao corte a forma de um prisma triangular de vértice interno sobre a lâmina espiral óssea e cuja base se situa na parede interna ou interior da lâmina de contornos, no ligamento espiral.

O vértice do triângulo está em íntima relação com o modíolo e com a lâmina espiral óssea.

A lâmina espiral óssea apresenta-se revestida por perióstio, e este forma na face externa uma goteira na qual se distinguem dois bordos, também denominados de lábios, o lábio vestibular ou ântero-superior e um lábio timpânico ou pósteroinferior

#### **Lâmina vestibular ou de Reissner**

O lábio vestibular continua-se pela lâmina vestibular ou de Reissner (Hachmeister, 2003)<sup>[4]</sup>, descrita por este autor em 1851 e posteriormente confirmada por Lowenberg em 1864.

Após a sua origem no lábio vestibular da lâmina espiral óssea, a lâmina vestibular ou de Reissner dirige-se para diante e para fora, separando a parede anterior do ducto coclear da rampa vestibular da cóclea, terminando na crista de inserção da lâmina vestibular ou de Reissner no ligamento espiral.

#### **Lâmina Basilar**

A lâmina basilar forma a parede pósteroinferior do ducto coclear e separa-a da rampa timpânica da cóclea.



Esta parede é mais complexa na sua estrutura do que a parede ântero-superior ou lâmina vestibular ou de Reissner.

Cada uma das espiras, apresenta no seu interior o ducto coclear, que é triangular ao corte e onde se descrevem três paredes:

#### 1.3.2.1. Parede superior ou vestibular

Esta parede é constituída pela lâmina vestibular ou de Reissner.

#### 1.3.2.2. Parede externa

Esta parede é limitada pela estria vascular e, externamente a esta, pelo ligamento espiral.

#### 1.3.2.3. Parede inferior ou coclear

Esta parede é constituída em grande parte da sua extensão pela lâmina basilar.

A largura da lâmina basilar aumenta da base para o ápice da cóclea, onde atinge a sua maior dimensão. A sua espessura diminui da base para o ápice.

Nela distinguem-se duas zonas, uma porção mais interna que se estende do modíolo ao pilar externo do túnel de Corti, e uma porção mais externa, pectínea, que se entende do pilar externo do túnel do Corti até à parede externa do labirinto membranoso.

##### 1.3.2.3.1. Órgão Espiral de Corti

Foi Alphonso Corti, nascido na Lombardia no século XIX, que em 1850 descreveu pela primeira vez o epitélio sensorial auditivo, o gânglio espiral, a membrana tectória e a estria vascular (Erich and Kley, 1952; Kley, 1986)<sup>[27][28]</sup>.

O órgão espiral de Corti repousa sobre a lâmina basilar.

Abaixo deste situam-se as células de sustentação, as células limitantes internas as células de Deiters, Hensen, Claudius e Bottcher.

E as células ciliadas internas e externas cujo papel na mecânica e fisiologia coclear foi tão bem enfatizado por Von Békésy (Von Békésy, 1954, 1955a, 1955b, 1956b, 1956a, 1965, 1966, 1969)<sup>[29-36]</sup>.

### 1.3.2.3.2. Células Ciliadas

A perspectiva actual, com o conhecimento de toda a rede sináptica que se origina nas células ciliadas, veio permitir um conhecimento mais aprofundado da mecânica destas células, e o conhecimento da tonotopia coclear.

As células ciliadas externas estão dispostas, no homem como no cobaio, em três a cinco fileiras.

Existe uma graduação em termos de dimensão do corpo celular destas células, da base para o ápice da cóclea, formando o corpo celular um ângulo agudo com a lâmina basilar.

A análise destas células ciliadas externas em microscopia electrónica de transmissão, (Zenner, 1986a, 1986b)<sup>[37][38]</sup> mostra que o seu núcleo ocupa uma posição basal, sendo que, abaixo deste e até à base da célula se identificam numerosas mitocôndrias.

A organização do retículo endoplasmático, possui uma rede lamelar, encontrando-se na base da célula a cisterna subsináptica, em relação com as fibras eferentes do nervo auditivo e com todo o sistema cisternal, que se apresenta pleno de mitocôndrias, permitindo adivinhar uma importantíssima actividade metabólica.

Os estereocílios têm um diâmetro de 0,2 a 0,8  $\mu\text{m}$  no homem surgindo como invaginações da membrana celular.

Strelioff em 1976<sup>[39]</sup>, Honrubia et al., 1976<sup>[40]</sup>; Sitko et al., 1976<sup>[41]</sup>; Flock and Strelioff, 1984<sup>[42-44]</sup>; Strelioff and Flock, 1984, 1985<sup>[44][45]</sup>), evidenciou nos seus trabalhos, que a rapidez dos estereocílios depende do sentido da deflecção, sendo maior quando esta se faz para a porção lateral da cóclea, sendo que, do ápex para a base a frequência de ressonância dos cílios das células ciliadas externas varia entre 1,2 e 22 kHz, completamente diferente do gradiente frequencial das células ciliadas internas que se situa entre 128 e 300 kHz.

Strelioff (Strelioff et al., 1976<sup>[39]</sup>; Strelioff and Flock, 1984<sup>[44]</sup>; Strelioff et al., 1985<sup>[45]</sup>) realçou a importância das células ciliadas externas na tonotopia coclear.

A fragilidade dos cílios das células sensoriais é tal que a estimulação acústica excessiva pode levar a uma alteração importante dos estereocílios, fenómeno de base do trauma acústico.

Spoendlin (Spoendlin, 1979c, 1979b, 1979a<sup>[46-48]</sup>; Spoendlin and Schrott, 1988<sup>[49]</sup>) evidenciou que a proporção da população de células ciliadas internas é de cerca de 12000 para 35000 células ciliadas externas.

Em termos de fibras aferentes, as que são provenientes das células ciliadas externas, representam apenas 5 a 10% dos neurónicos aferentes do nervo coclear.

Spoendlin (Spoendlin, 1979c, 1979b<sup>[47][48]</sup>; Liberman, 1982a, 1982b<sup>[50][51]</sup>; Spoendlin and Schrott, 1988<sup>[49]</sup>), demonstrou a relação das fibras aferentes com as células de tipo II do gânglio espiral.

Em termos de neurónios eferentes, cada um deles apresenta axónios mielinizados com origem no complexo olivar superior sendo que cada um deles se relaciona com vinte a cinquenta células ciliadas externas.

Os neuromediadores são para os neurónios transmissores, a acetilcolina e o GABA (Yuan W. X. et al., 2009<sup>[52]</sup>; Peng et al., 2011<sup>[53]</sup>; Iasnetsov et al., 2014<sup>[54]</sup>).

As células ciliadas externas possuem uma actividade mecânica, claramente demonstrada por Kemp (Kemp, 1978, 1979, 2002<sup>[55-57]</sup>), quando evidenciou as otoemissões acústicas de origem endococlear.

Directamente responsáveis pela mecânica coclear e pelo potencial microfónico coclear, temos as cisternas lamelares que servirão de reserva de  $Ca^{++}$  intracelular, sendo as mitocôndrias, em que estas células são particularmente ricas, responsáveis pelo metabolismo oxidativo produtor de ATP.

Assim, a inervação principal das células ciliadas externas é de tipo eferente em contraste com as células ciliadas internas que têm inervação do tipo aferente.

A morfologia e a fisiologia coclear permitem explicar o fenómeno das otoemissões acústicas, de grande valor diagnóstico.

A explicação das oto-emissões acústicas e transmissão do som até a lâmina basilar reside no seguinte fenómeno:

As vibrações do estribo acompanham-se de variações de pressão no líquido contido na rampa vestibular. Gera-se assim uma diferença de pressão entre a rampa vestibular e a rampa timpânica.

Békésy, (Von Békésy, 1966)<sup>[30]</sup>, demonstrou que devido à sua reduzida espessura a lâmina vestibular ou de Reissner possui uma rigidez muito reduzida, em contraste com a lâmina basilar, o que determina que as propriedades mecânicas desta determinem um modo de vibração, sob a forma de onda descrita como onda viajante.

As características físicas da lâmina basilar levam a que a sua vibração, e a vibração da membrana tectória, encarcerem as células ciliadas, sendo a amplitude de vibração dos cílios determinada pela amplitude da onda propagada ao longo da própria lâmina basilar.

As otoemissões acústicas têm valor diagnóstico pois estão diminuídas ou ausentes em caso de surdez endococlear.

As células ciliadas internas dispõem-se apenas numa fileira ao longo do órgão espiral de Corti.

A inervação aferente das células ciliadas internas, faz-se através de neurónios ganglionares de tipo I.

Lavigne (Lavigne-Rebillard and Bagger-Sjoberg, 1992)<sup>[58]</sup> realizaram o estudo de treze cócleas fetais humanas, em microscopia electrónica de varredura.

Verificaram que a ciliogénese se iniciava em diferentes fases do desenvolvimento embriológico, para as células ciliadas externas e células ciliadas internas.

As células ciliadas internas iniciam a ciliogénese à 11.º semana de desenvolvimento e as células ciliadas externas iniciam a formação dos estereocílios à 23.º semana de desenvolvimento.

Entre a 20.ª e 22.ª semana, as células ciliadas possuem já a estrutura que irão apresentar no adulto, sendo que as células ciliadas internas têm a distribuição característica, em apenas uma fileira, e as células ciliadas externas já têm a sua disposição característica em várias fileiras. Embora, algum grau de desorganização das células ciliadas externas indique que a completa maturação das células ciliadas se verifica apenas durante o 3.º trimestre de gestação.

Os trabalhos de Strelioff (Strelioff et al., 1985)<sup>[45]</sup> evidenciam que as células ciliadas internas se comportam como receptores passivos, enquanto as células ciliadas externas, com a interacção da membrana tectória contribuem para a selectividade frequencial da cóclea.

Chan, K.H. (Chan et al., 1991)<sup>[59]</sup>, evidenciou a deterioração das células ciliadas externas, quando de trauma acústico, através de uma diminuição da dimensão celular das células ciliadas externas após exposição ao ruído, situação esta, parcialmente reversível ao fim de duas semanas com reposição das suas características morfológicas.

Este autor considera no órgão espiral de Corti, duas entidades estruturais distintas, uma estrutura interna mais estável, composta pelas células ciliadas internas, com as suas células de suporte e os pilares interno e externo, esta zona sendo relativamente estável quando de trauma acústico, e uma zona externa que integra as células ciliadas externas, as células de Deiters e as células de Hensen, e em que o trauma acústico tem maiores repercussões. Esta zona externa, quando de trauma acústico, sofre alterações estruturais, que levam a que, com o aumento de intensidade do som, as células de Deiters e as células de Hensen se movam de modo centrípeto em

direcção ao centro do modíolo, com diminuição da sensibilidade ao som, no que representaria um mecanismo de protecção das células de suporte.

A fisiologia coclear é extremamente complexa e o epitélio coclear extraordinariamente frágil.

Será possível num futuro próximo recriar o epitélio sensorial com células sensoriais viáveis?

Qual a importância da microvascularização coclear em todo este processo?

#### 1.4. Vascularização da Cóclea — O estado da arte

Com recurso ao excelente trabalho de Mudry (Mudry and Tange, 2009)<sup>[60]</sup>, segue-se uma breve resenha histórica sobre o estudo da vascularização da cóclea.

A primeira descrição anatómica da cóclea reporta-se ao século XVI, por Falópio (Hachmeister, 2003<sup>[4]</sup>; Mudry, 2009<sup>[61]</sup>; Mudry and Tange, 2009<sup>[60]</sup>). Este autor, contemporâneo de Vesalius (Hachmeister, 2003<sup>[4]</sup>; Mudry, 2009<sup>[61]</sup>; Mudry and Tange, 2009<sup>[60]</sup>), descreveu a cóclea como correspondendo à *tertia cavitas* do ouvido interno, sendo que o vestíbulo e os canais semicirculares, correspondiam à *secunda cavitas*.

Também para o estudo da vascularização a injeção vascular, que tem uma longa história, tem particular relevância.

O início da injeção vascular reporta, pelo menos ao séc. XIV, com a injeção no cadáver de líquidos coloridos nos vasos sanguíneos, por Alessandra Gilliani (Mudry and Tange, 2009)<sup>[60]</sup>. Jacobus Berengarius, no séc. XVI, em 1521, procedeu à injeção de água aquecida na veia renal. Nicolas Massa em 1536, injectou ar na veia renal (Hachmeister, 2003)<sup>[4]</sup>. Carolus Stephanus em 1545, injectou ar no sistema venoso, segundo Mudry (Mudry and Tange, 2009)<sup>[60]</sup>. Bartholomeo Eustachius, contemporâneo de Vesalius (Mudry and Tange, 2009)<sup>[60]</sup>, em 1563, injectou ar e água no sistema arterial e venoso renal (Hachmeister, 2003; Mudry, 2009; Mudry and Tange, 2009)<sup>[4][60][61]</sup>.

Também no séc. XVI, diferentes materiais não sólidos, foram injectados no sistema vascular e também no sistema nervoso central de cadáver.

No séc. XVII, as experiências com diferentes produtos de injeção em cadáver prosseguiram. Jean Riolan, em 1652 injectou ar nos vasos sanguíneos (Mudry and Tange, 2009)<sup>[60]</sup>. Francis Gilisson em 1654 (Mudry and Tange, 2009)<sup>[60]</sup>, injectou

diferentes produtos, água, leite, açafão e tinta nos vasos sanguíneos. Christopher Wren, em 1656, injectou vinho nos vasos sanguíneos (Mudry and Tange, 2009)<sup>[60]</sup>. Johann Jacob Wepper, em 1658, injectou água de açafão nas meninges (Mudry and Tange, 2009)<sup>[60]</sup>. Reigner de Graaf, em 1668 injectou água colorida para visualização do sistema arterial nos testículos e ovários, Mudry (Mudry and Tange, 2009)<sup>[60]</sup>.

Também no século XVII, iniciou-se a injeção de materiais sujeitos a posterior solidificação no sistema arterial.

Robert Boyle, em 1663 (Mudry and Tange, 2009)<sup>[60]</sup>, injectou gelatina nos vasos sanguíneos.

Jan Swammerdam em 1666 (Mudry and Tange, 2009)<sup>[60]</sup> faz injeção de cera no sistema vascular.

Numa primeira contribuição para o estudo da vascularização coclear, Valsalva, em 1704 (Hachmeister, 2003; Mudry, 2009; Mudry and Tange, 2009)<sup>[4][60][61]</sup>, identifica a presença de vasos sanguíneos e capilares em relação com a distribuição do nervo auditivo.

Ruysch, 1718 (Mudry and Tange, 2009)<sup>[60]</sup>, descreve dois ramos arteriais que penetram o vestíbulo, e depois se dividem, num ramo direito e num ramo esquerdo.

Soemmerring em 1806 (Mudry and Tange, 2009)<sup>[60]</sup>, descreve catorze ramos na artéria labiríntica.

Será no entanto Breschet, em 1836 (Breschet, 1836)<sup>[62]</sup>, que descreve toda a estrutura da cóclea e as artérias da lâmina espiral óssea.

Também Hyrtl, perito em técnicas de injeção e corrosão macroscópicas, dá a sua contribuição para o estudo da vascularização coclear.

A escassez de dados e de descrições, é em parte devida à dificuldade de estudo deste órgão, pela sua localização no interior do rochedo do osso temporal.

Será no entanto com o advento do microscópio que a maior sofisticação técnica irá permitir um estudo mais aprofundado da vascularização coclear.

Ibsen descreve a artéria espiralada e descreve-a caminhando num canal próprio.

Será Schwalbe, em 1887 (Mudry and Tange, 2009)<sup>[60]</sup>, que publica em «Lehrbuch der Anatomie der Sinnesorgane», a sua interpretação de toda a microscopia óptica coclear, descrevendo a vascularização coclear.

Schwalbe (Mudry and Tange, 2009)<sup>[60]</sup> descreve as artérias com trajecto flexuoso em relação com o modíolo e descreve um conjunto de vasos arteriais em forma de novelo, que por analogia na sua forma com o glomérulo renal denomina de glomérulos

cocleares, os glomérulos de Schwalbe. Descreve glomérulos *major* (Mudry and Tange, 2009)<sup>[60]</sup> que vascularizam a lâmina basilar e o ligamento espiral e glomérulos *minor* (Nabeya, 1923)<sup>[63]</sup> que vascularizam a lâmina vestibular ou de Reissner.

Em 1893, Schiller (Mudry and Tange, 2009)<sup>[60]</sup>, usa um produto de injeção extraordinariamente fluído, a tinta-da-China, e Siebenmann em 1894<sup>[60]</sup> utiliza como produto de injeção o azul da Prússia. A posterior descalcificação do órgão, após fixação e diafanização das estruturas, permitiria a observação detalhada dos vasos injectados.

Nabeya, 1923 (Nabeya, 1923)<sup>[63]</sup>, deu uma importante contribuição para o estudo da cóclea nos mamíferos em geral, ressaltando a sua semelhança.

Smith, (Smith, 1951)<sup>[64]</sup> descreve com grande pormenor a cóclea, no cobaio. Descreve quatro sectores de vascularização, o sector do ligamento espiral na sua porção superior, o sector da estria *vascularis*, o sector do ligamento espiral e o sector da proeminência espiral.

Charachon (Charachon, 1961)<sup>[65]</sup> elabora a sua tese descrevendo a anatomia da artéria auditiva interna no homem após injeção de resina epóxi.

Axelsson (Axelsson, 1968, 1972, 1978; Axelsson and Ernstson, 1972; Axelsson, 1988; Axelsson et al., 1990)<sup>[66-71]</sup>, na Suécia, realça a falta de detalhe do estudo da microvascularização coclear e sublinha que a controvérsia de resultados resulta do uso de diferentes espécies e de diferentes métodos de investigação.

No seu trabalho, «Anatomia vascular da cóclea no cobaio e no homem» em 1968, Axelsson começa por analisar os diferentes trabalhos sobre o tema realizados em mamíferos. Refere como característica das várias espécies o facto de haver uma origem comum na artéria labiríntica, que embora com origem mais frequente na artéria cerebelosa ântero-inferior, pode também originar-se na artéria basilar ou na artéria vertebral. Realça a semelhança entre a vascularização coclear no homem e no cobaio e restabelece um paralelo entre as várias artérias, e analisa em detalhe cada uma das regiões da cóclea, comparando trabalhos de Siebermann, Nabeya e Carachon (cit. Axelsson)<sup>[68][70][72]</sup>. Destaca o papel da estria vascular, estudada por Retzius (1882), que de modo inequívoco provou que se tratava de um epitélio vascularizado, e sublinha o interesse e importância desta estrutura na formação e absorção de endolinfa. Para este estudo injectou 163 cobaios adultos com Azul de Berlim, procedeu à fixação e descalcificação da cóclea e à dissecação após remoção do muco-periósteo envolvente. Descreve as arteríolas radiárias e sublinha a sua importância e descreve menor profusão capilar na região apical relativamente à base da cóclea.



Descreve a vascularização do modíolo, da lâmina espiral óssea, da parede externa e da espira basal. Conclui dizendo que não há grandes diferenças no padrão de vascularização no cobaio e no Homem.

Em 1974, Axelsson (Axelsson, 1974)<sup>[73]</sup> publica o seu estudo em macaco Rhesus, considerando-o como um excelente modelo animal para o estudo da vascularização coclear.

Em 1988, Ryan (Ryan et al., 1988)<sup>[74]</sup> da Universidade de S. Diego realça a íntima relação entre a vascularização coclear e a função coclear e descreve as características comuns, no que respeita à vascularização coclear nos vários mamíferos.

Em 1990, em colaboração com Nuttall e Miller, citado por Axelsson (Axelsson et al., 1990)<sup>[66]</sup> publica um estudo interessante sobre o uso da microscopia intravital para observação da microcirculação coclear.

Em 1991, Y. Nakai<sup>[75]</sup> publica um estudo realizado em microscopia electrónica de varrimento após hidrópia experimental.

Hawkins (Hawkins, 1976)<sup>[76]</sup> documenta um novo esquema de microvascularização coclear, enfatizando a importância dos vasos da parede externa, e realçando as características evolutivas da microvascularização coclear ao longo da vida. Miodonski, (Miodonski et al., 1993)<sup>[77]</sup>, discorda de Hawkins no que se refere à distribuição vascular na parede externa da cóclea.

Em 1984 Murakami (Murakami et al., 1984)<sup>[78]</sup> introduz uma nova resina, *Mercox*®, para injeção vascular em estudos de microscopia electrónica de varrimento, resina esta aplicada ao estudo da cóclea também por Miodonski.

Embora ainda com alguma controvérsia, dada a importância dos factores vasculares em toda a patologia coclear, estes estudos tornam-se essenciais para a compreensão da etiopatogenia da lesão coclear.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS DE ESTUDO

## 2.1. MATERIAL DE ESTUDO

### ANIMAL DE EXPERIÊNCIA

Este estudo foi realizado em 100 cobaios, *Cavia porcellus*, de ambos os géneros com peso médio de 450g.

O ser designado por *guinea pig* deve-se ao facto de ser originário do continente americano que era então conhecido por Índia Ocidental.

Em termos de classificação zoológica:

- **Reino:** Animalia
- **Filo:** Chordata
- **Classe:** Mammalia
- **Ordem:** Rodentia
- **Família:** Caviidae
- **Género:** Cavia
- **Espécie:** Cavia. Porcellus

O *Cavia porcellus*, *guinea pig*, tem sido amplamente usado em estudos experimentais, devido ao facto de ter grandes semelhanças biológicas com o homem.

Os estudos experimentais com estes animais foram fundamentais para a descoberta da vitamina C, do bacilo de Koch e da adrenalina.

O cobaio foi usado como modelo experimental na elaboração da vacina da difteria e vacina da tuberculose, nas técnicas de diálise renal e substituição valvular cardíaca e na experimentação de vários medicamentos.

O cobaio está implicado na realização de inúmeros estudos sobre a audição, e na génese de estudos microvasculares aplicados a diferentes órgãos. É o animal experimental de excelência em estudos de microvascularização do ouvido interno e estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* sobre mecânica e fisiologia e fisiopatologia coclear.

Em 1961 Georg von Békésy (Von Békésy, 1954, 1955b, 1955a, 1956a, 1958, 1959) recebeu o prémio Nobel ao descrever a mecânica coclear no cobaio. A primeira tentativa de regeneração das células ciliadas de um mamífero, em 2003, foi realizada também no cobaio<sup>[32][34-36][79][80]</sup>.

Os cobaios usados neste estudo foram sujeitos a experimentação segundo o protocolo adiante discriminado.

## 2.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas e as condições de experimentação animal obedeceram às mais recentes directivas da Comissão Europeia.

Em todo o processo experimental foi utilizado o preceituado nestas directivas, e todo o trabalho experimental anterior às mesmas pode considerar-se abrangido pelo espírito das mesmas.

### 2.2.1. Legislação para fins experimentais

Em 24 de Novembro de 1986, o Conselho da Europa adoptou a Directiva 86/609/CEE (Europa, 1986)<sup>[81]</sup>, a fim de eliminar as disparidades entre as disposições regulamentares, legislativas e administrativas dos Estados-Membros sobre a protecção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos.

Existem novos conhecimentos científicos relativamente aos factores que influenciam o bem-estar dos animais e a capacidade dos mesmos para sentir e manifestar dor, sofrimento ou angústia. Importa melhorar a sua comodidade quando utilizados em procedimentos científicos, reforçando as normas mínimas relativas à sua protecção, de acordo com a evolução mais recente do conhecimento.

A atitude em relação aos animais, depende também de directivas nacionais, e em determinados Estados-Membros da exigência de manter regras de bem-estar dos animais mais amplas do que as acordadas a nível da União. No interesse dos animais e desde que tal não afecte o funcionamento do “mercado interno”, é conveniente conceder aos Estados-Membros uma certa flexibilidade.

Surgiu assim a directiva 2010/63 EU do Parlamento Europeu de 22 Setembro de 2010 (U.E., 2010)<sup>[82]</sup> da qual destaco os artigos mais relevantes:

**Artigo 10.º da directiva 63/2010 da EU:**

Animais criados para utilização em procedimentos

1. Os Estados-Membros asseguram que os animais pertencentes às espécies enumeradas no anexo I só possam ser utilizados em procedimentos se tiverem sido criados para esse efeito.

Procedimentos

1. Os Estados-Membros asseguram que os procedimentos sejam realizados no estabelecimento de um utilizador.

**Artigo 13.º da directiva 63/2010 da EU:**

Escolha de métodos

1. Sem prejuízo da legislação nacional que proíba determinados tipos de métodos, os Estados-Membros asseguram que os procedimentos não sejam realizados se, ao abrigo da legislação da União, for reconhecido outro método ou estratégia de ensaio, para obter os resultados pretendidos que não implique a utilização de animais vivos.
2. Aquando da escolha de procedimentos, são seleccionados os que satisfaçam os seguintes requisitos, a saber, os que:
  - a) Utilizem o menor número possível de animais;
  - b) Escolham animais com menor capacidade para sentir dor, sofrimento, angústia ou danos duradouros.
  - c) Causem o menos possível de dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro, com as maiores probabilidades de proporcionar resultados satisfatórios.
3. A morte como limite crítico de um procedimento é evitada tanto quanto possível e é substituída por limites críticos precoces. Caso a morte como limite crítico seja inevitável, o procedimento é concebido por forma a:
  - a) Acarretar a morte do menor número possível de animais.

- b) Reduzir ao mínimo possível a duração e a intensidade de sofrimento do animal e, tanto quanto possível, assegurar uma morte indolor.

**Artigo 14.º da directiva 63/2010 da EU:**

**Anestesia**

1. Os Estados-Membros asseguram que, a menos que tal não seja adequado, os procedimentos sejam efectuados sob anestesia geral ou local ou que sejam utilizados analgésicos ou outro método adequado para assegurar que a dor, o sofrimento e a angústia sejam reduzidos ao mínimo.  
Os procedimentos que impliquem lesões graves que possam causar dor severa não podem ser efectuados sem anestesia.
2. Aquando da decisão sobre a adequabilidade de ser utilizada anestesia, tem-se em conta o seguinte:
  - a) Se a anestesia é considerada mais traumatizante para o animal do que o próprio procedimento.
  - b) Se a anestesia é incompatível com o objectivo do procedimento.
3. Os Estados-Membros asseguram que não sejam administradas quaisquer substâncias aos animais que os impeçam ou restrinjam de manifestar dor, sem que lhes tenha sido induzido um nível adequado de anestesia ou de analgesia.  
Nesses casos, é apresentada uma justificação científica, acompanhada pelos detalhes do regime anestésico ou analgésico.
4. Um animal que possa vir a sofrer dor uma vez passado o efeito da anestesia, recebe tratamento analgésico no pré e pós-operatório, ou é tratado por outros métodos adequados para aliviar a dor, desde que sejam compatíveis com o objectivo do procedimento.
5. Logo que se atinja o objectivo do procedimento, são tomadas medidas adequadas para minimizar o sofrimento do animal.

Todo este preceituado foi aplicado no presente estudo. Ao analisar os casos de experimentação animal realizada anteriormente a 2010, o procedimento então adoptado está em perfeita consonância com o espírito desta legislação.

## 2.2.2. Protocolo experimental

### 2.2.2.1. Alojamento no biotério

No biotério os cobaios estiveram alojadas em gaiolas MAC IV, com área de 1800 cm<sup>2</sup>, em grupos de duas.

O controlo ambiental incluiu temperatura da sala constante, a 24°C, humidade entre 45% e 65%, ciclo de luminosidade dia/noite de 12 horas. Procedeu-se ao enriquecimento da gaiola com resguardo, limpeza e manutenção diária das instalações, com eliminação de dejectos por água corrente.

O bem-estar dos animais, nos seus múltiplos aspectos, foi assegurado pelo pessoal técnico do Centro de Investigação do Departamento de Anatomia.

A alimentação consistiu em água filtrada *ad libitum*, feno de trevo *ad libitum*, ervas frescas (dente de leão), legumes ricos em ácido ascórbico (100 g/dia) e suplemento diário de vitamina C (20 microgramas), directamente, na boca.

### 2.2.2.2. Protocolo anestésico

O animal de experimentação escolhido *Cavia porcellus*, vulgo cobaio, requer um procedimento pré anestésico de alguma complexidade, quer no que se refere às condições do meio ambiente quer quanto à necessidade de realização de medicação pré-anestésica. Trata-se de um animal extraordinariamente alerta a todos os estímulos exteriores, com especial destaque para o ruído que lhe causa grande *stress*.

Para profilaxia do *stress* relacionado com o acesso à sala de operações, proporcionou-se estadia do animal por curtos períodos de tempo previamente ao procedimento cirúrgico.

As vias de administração terapêutica no cobaio são a via oral e a via parentérica, incluindo esta os acessos intraperitoneal, intramuscular, subcutâneo, intradérmico e endovenoso.

A pré-medicação foi realizada com *Diazepam*® na dose de 2,5 mg/kg de peso, em administração parentérica intraperitoneal ou intramuscular.

Todo o procedimento cirúrgico foi realizado no bloco operatório do Departamento de Anatomia, à semelhança de vários projectos de investigação realizados por diferentes investigadores.

Os animais de experiência foram anestesiados com administração intraperitoneal de Ketamina, (Quetamina)<sup>®</sup>, na dose de 40 mg/kg e uma vez que esta, se isolada, não provoca analgesia, fez-se a combinação com xilazina, Xylazin<sup>®</sup>, na dose de 5 mg /kg, a qual provoca uma adequada analgesia.

A anestesia foi mantida com máscara aberta de oxigénio durante toda a intervenção.

### 2.2.2.3. Protocolo cirúrgico

Após a indução da anestesia, foi realizada fixação do animal em decúbito dorsal.

Realizou-se esternotomia paramediana, incisão cutânea sagital desde o nível da fúrcula esternal até cerca de 1 cm acima do vértice do apêndice xifóide e colocação de afastador automático junto aos bordos do esterno. Foi feita cauterização dos pontos sangrantes e laqueação da artéria torácica interna.

Após abertura da cavidade torácica, realizou-se pericardiotomia seguindo a direcção do sulco interventricular anterior.

Após exposição da massa ventricular, realizou-se ventriculotomia esquerda, e introduziu-se cânula de calibre adequado (*Abbocat*<sup>®</sup>, calibre 14), dirigindo-a para a câmara de saída para canulação da porção ascendente da artéria aorta e foi feita a sua laqueação ao nível da porção média da aorta ascendente. Foi administrado soro fisiológico para lavagem vascular, heparinizado e aquecido a 37 °C, em perfusão gota-a-gota.

Procedeu-se a flebotomia da veia cava inferior e canulação da mesma. O animal foi eutanasiado por exsanguinação.

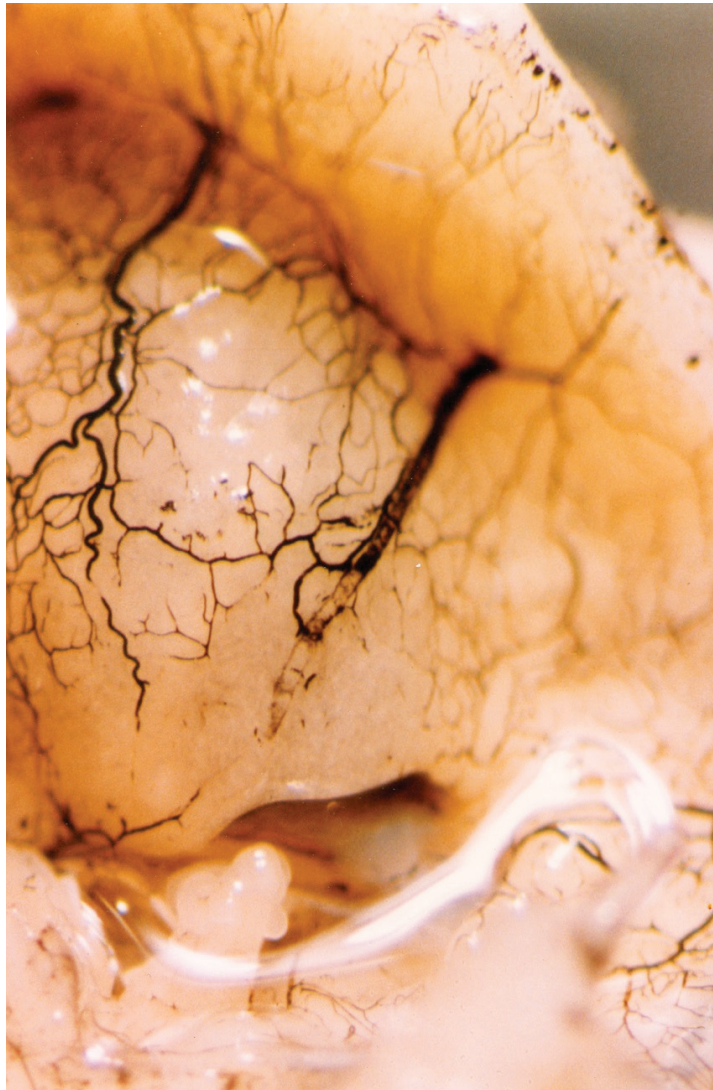
Previamente à perfusão dos produtos de injeção foi realizada segunda lavagem vascular, para fixação de vasos e tecidos, com perfusão de 60 cc de gluteraldeído a 2,2% tamponado com tampão difosfato com pH=7,4, com osmolaridade superior a 220 mOsm. O fixador foi perfundido à pressão constante de 120 mmHg, com débito constante.

Injectou-se seguidamente o produto que melhor se adaptaria a cada uma das técnicas de estudo.



## 2.3. TÉCNICAS DE ESTUDO

### 2.3.1. Técnica de Injecção-Microdissecção



**FIG. 6** Técnica de injecção-microdissecção — 10x.  
Observação da cóclea após dissecção e abertura da *bulla*.  
Injecção vascular com tinta-da-China

A técnica de injecção-microdissecção foi utilizada em 23 casos (**FIG. 6**).

Com a técnica de injecção-microdissecção pretendeu-se ter visão estereoscópica da peça, com acesso às várias regiões da cóclea que só após uma cuidada dissecção

poderiam ser observadas. Os produtos de injeção foram a tinta-da-China, com a qual se obteve uma ótima perfusão vascular, a suspensão coloidal de sulfato de bário, a 20% *Micropaque*®, adicionado de gelatina a 10% previamente aquecida a 37 °C e seguidamente adicionada de pigmento de cor amarela ou vermelha. (Goyri-O'Neill, 1984b)<sup>[83]</sup>.

Após a injeção vascular e assistolia do animal, a extremidade cefálica foi retirada e dissecada a porção mastoideia do temporal ou *bulla*, com abertura desta e excisão da cóclea.

Procedeu-se seguidamente à descalcificação das peças, pois de outro modo não teria sido possível a respectiva microdissecção.

A descalcificação processou-se por 2 métodos:

1. Descalcificação com EDTA, ácido aminopolicarboxílico cuja base é o diamino-tetraacetato etilénico, de acordo com o já descrito por vários autores (Chevance, 1963; Gussen and Donahue, 1965; Chole and Charpied, 1981; Kappelmann et al., 1987; Madden and Henson, 1997; Kimura et al., 2013)<sup>[84-89]</sup>.

Foi feita imersão do fragmento em solução de EDTA a 5% em solução salina (5 g de EDTA em 100 ml de solução salina) até que a descalcificação estivesse completa. Após testar o grau de descalcificação procedeu-se a lavagem abundante em água corrente.

2. Descalcificação pelo ácido nítrico (Moodycliffe, 1960; Perez-Heredia et al., 2008; Ferrer-Luque et al., 2013; Prasad, 2013)<sup>[90-93]</sup>.

Colocou-se a peça em solução aquosa de ácido nítrico a 4% e após descalcificação procedeu-se a lavagem da peça.

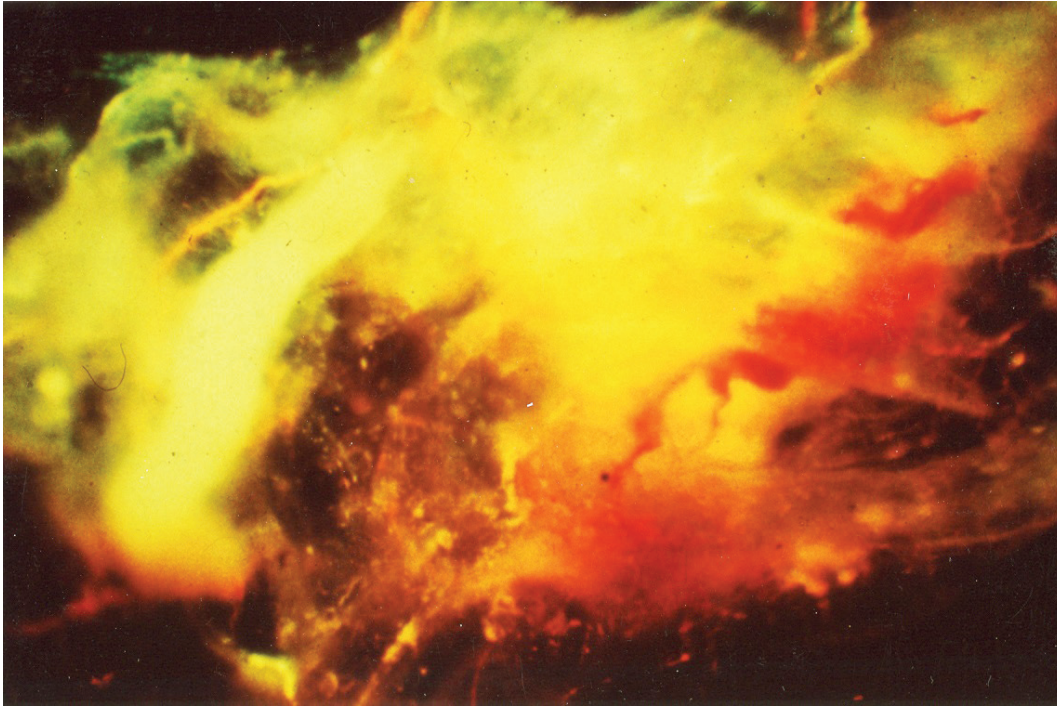
Durante esta fase a cóclea não foi dissecada, após o que se procedeu à remoção do perióstio ficando intacta a cóclea membranosa.

Procedeu-se então à microdissecção da cóclea sob controlo à lupa estereoscópica, executando cortes ápico-basais segundo um eixo paralelo ao eixo do modíolo ou cortes com incidência perpendicular ao eixo do modíolo.

Seguiu-se a observação minuciosa das várias estruturas constituintes do labirinto ósseo e membranoso, fotografando os aspectos mais sugestivos.

As peças processadas segundo esta técnica foram minuciosamente estudadas através de observação em lupa estereoscópica (marca MEIJI, modelo EMZ – 13TR, Olympus) e em microscópio com baixa ampliação.

### 2.3.2. Técnica de Injecção-Diafanização



**FIG. 7** Técnica de injecção-diafanização. Observação da artéria espiralada e nervo coclear com total transparência das estruturas circundantes — 50x.

Injecção vascular com gelatina corada com pigmento vermelho

A técnica de injecção-diafanização foi utilizada em 37 casos (FIG. 7).

A diafanização é um processo, por fases, em que mediante reacções químicas sobre um órgão ou tecido é possível obter a sua transparência, o que neste caso permite observação de toda a rede vascular previamente injectada.

Após lavagem e fixação do leito vascular com gluteraldeído, procedeu-se à injecção vascular de suspensão coloidal de sulfato de bário, *Micropaque*®, adicionado de gelatina a 10% aquecida a 37 °C e pigmento de cor amarela ou vermelha.

Dada a dificuldade de controlo da injecção vascular a nível da cóclea por impossibilidade de visualização da mesma durante a injecção, injectou-se quantidade aproximada de 60 ml a 80ml a pressão constante, sendo esta calculada a partir do volume total de volémia, calculado por correspondência ao peso do animal.

A perfusão prosseguiu até que o produto de contraste não fosse passível de injecção sem resistência.

Após conclusão da injeção vascular procedeu-se à abertura do crânio por via occipital e abertura das bullas timpânicas com excisão da cóclea. Procedeu-se em seguida à fixação das cócleas por imersão em gluteraldeído durante 24 horas.

Procedeu-se à descalcificação das peças em EDTA.

Após descalcificação as peças foram processadas segundo a técnica de diafanização em uso no Serviço, a técnica de Spalteholz modificada (Goyri-O'Neill, 1984a; Goyri-O'Neill, 1984)<sup>[83][94]</sup>.

Esta técnica sofreu aperfeiçoamento relativamente à técnica original, essencialmente:

Na fase de branqueamento, que é feito com água oxigenada a 10V, na fase de desidratação e na fase de clarificação.

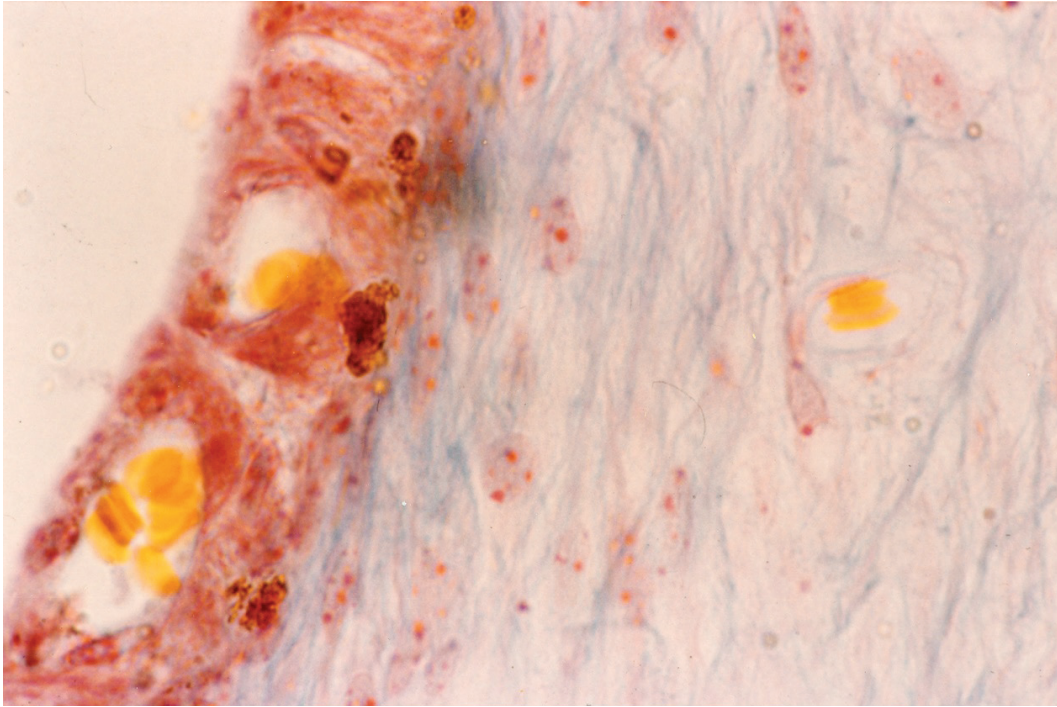
Na fase de desidratação, que é realizada com recurso ao monoetilenoglicol e dietilenoglicol, ambos com potentes propriedades higroscópicas, requerendo menor número de passagens em cada uma destas substâncias, neste caso 48h em cada um dos líquidos. No final desta fase, completa-se a desidratação pelo método de «freeze substitution» (Goyri-O'Neill, 1982)<sup>[95]</sup> com acetona em concentrações crescentes, a 75%, a 80%, a 85% a 90% e a 93%, à temperatura de -20 °C.

Na fase de clarificação, esta foi obtida por imersão da peça em líquido de Spalteholz (1914)<sup>[96]</sup>, salicilato de metilo e benzoato de benzilo, na proporção de 3:1, com aplicação de vácuo até 0,2 bares durante 15 minutos.

As peças processadas segundo esta técnica foram minuciosamente estudadas através de observação em lupa estereoscópica (marca MEIJI, modelo EMZ – 13TR, Olympus) com zoom e em microscópio com baixa ampliação.



### 2.3.3 Técnica Histológica



**FIG. 8** Técnica histológica. Coloração de tricrômico de Masson — 420x.  
Pormenor do ligamento espiral e da estria vascular

A técnica histológica foi realizada em 14 casos (**FIG. 8**).

Gostaria de frisar que em todo o processamento histológico da fase inicial destes trabalhos tive o privilégio de trabalhar sob orientação do Professor Doutor Manuel João Xavier Mourato. A adequação das diferentes colorações ao tecido e órgão a estudar foi feita sobre a sua supervisão e orientação, bem como o processamento técnico nas várias fases de descalcificação das peças. Sob sua orientação, a compreensão e conhecimento da dificuldade técnica do órgão a estudar, transformaram momentos de algum desânimo, pela grande dificuldade e morosidade técnica, em novos reptos.

Em 12 casos, para observação detalhada da vascularização arterial de toda a cóclea, foi realizada injeção vascular prévia.

Foi injectada tinta-da-China ou gelatina a 10%, aquecida a 38 °C e adicionada de pigmento de cor vermelha.

Como é sabido, o ouvido interno necessita de cuidados especiais no que se refere à fixação, pelo que esta foi sempre realizada por perfusão vascular de gluteraldeído

a 2,2%, tamponado com tampão difosfato à temperatura de 38 °C, a que se seguiu imersão da peça no soluto.

A descalcificação processou-se com ácido nítrico a 5%, com ácido tricloroacético ou etilenodiaminotetracetato de sódio.

Após a descalcificação, no primeiro caso as peças foram tratadas com sulfato de sódio a 5% e depois lavadas em água corrente antes de serem desidratadas, no segundo caso as peças descalcificadas eram directamente transferidas para o álcool e no caso da descalcificação com EDTA fazia-se a lavagem com álcool ou água.

Seguidamente procedeu-se à desidratação pelos álcoois de concentração crescente a 70°, 90° e 100° em duas passagens sucessivas, por períodos de 24 horas.

Seguiu-se a inclusão. Quando as peças eram incluídas em parafina, procedia-se à passagem por xilol.

Em menor número de casos, devido à morosidade da técnica, procedeu-se à inclusão em celoidina.

Após a realização dos cortes e execução das lâminas procedeu-se à coloração das lâminas por três métodos distintos, consoante a estrutura a destacar.

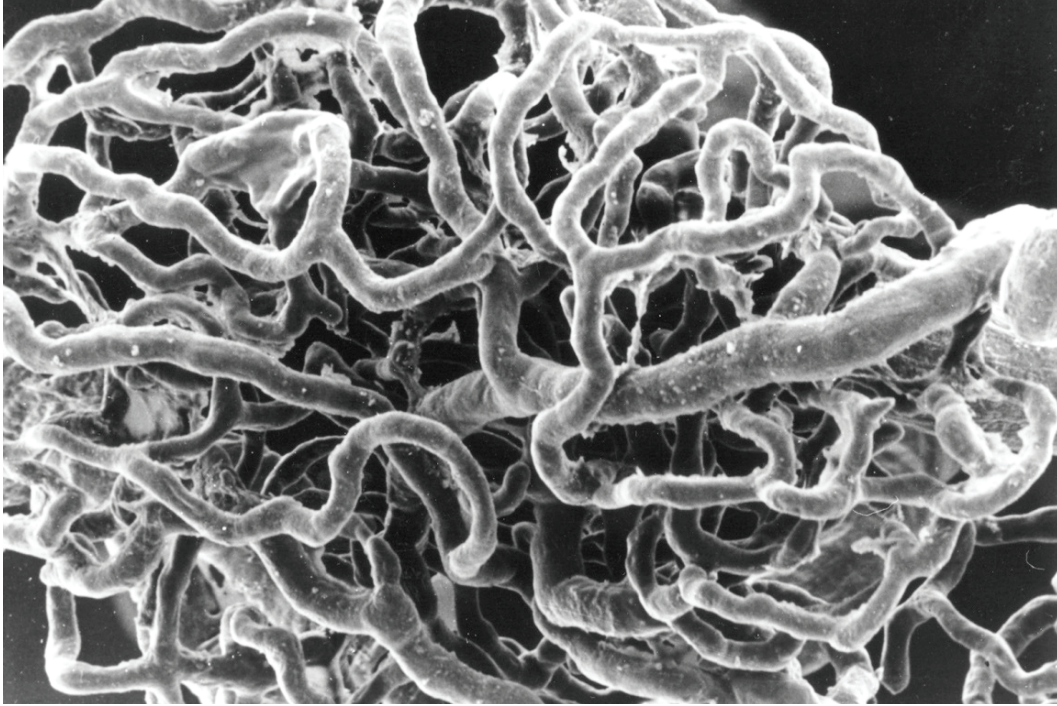
A **coloração de hematoxilina-eosina**, talvez a coloração mais usada em histologia, proporcionou excelentes resultados e excelente contraste nas peças injectadas com tinta-da-China. A hematoxilina é um corante básico, de cor azul, com grande afinidade para os núcleos da célula, que cora de púrpura. A eosina é um corante ácido, com grande afinidade para as mitocôndrias e citoplasma, que cora de rosa.

A **coloração de Mallory-azan** foi descrita por Frank Mallory, modificada por Heidenhain e novamente descrita por Kiernan (Kiernan, 2008)<sup>[96]</sup>, sendo uma coloração particularmente adequada para o estudo do tecido conjuntivo. O núcleo é corado com uma hematoxilina férrica e cora em vermelho, as fibras de colagénio em azul, a cartilagem e a matriz óssea em diferentes tons de azul, as hemácias e a fibrina em vermelho.

Um outro tipo de tricrómico utilizado foi o **tricrómico de Masson** (Kiernan, 2008)<sup>[96]</sup>, que permite uma excelente distinção entre as fibras musculares lisas e o colagénio. O núcleo cora de azul, o colagénio cora de verde ou azul, o citoplasma, o músculo e os eritrócitos coram de vermelho.

Para uma observação mais correcta das fibras aferentes e eferentes do gânglio espiral de Corti, diferenciação da nevrógia e das fibras de reticulina procedemos em alguns casos à impregnação pela prata segundo o **método de Gomori**.

#### 2.3.4. Técnica de Microscopia Electrónica de Varrimento em Moldes Vasculares



**FIG. 9** Técnica de microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares — 480x.  
Glomérulo de Schwalbe.

A técnica de microscopia electrónica de varredura em moldes vasculares (Murakami et al., 1984; Lametschwandtner et al., 1984, 1990)<sup>[78][98][107]</sup> foi utilizada em 26 casos (FIG. 9).

Após perfusão vascular com gluteraldeído a 2,2% tamponado com tampão difosfato à temperatura de 38 °C, tendo-se verificado assistolia do animal, procedeu-se à injeção de cerca de 50 ml de uma resina acrílica com grande poder de perfusão, *Mercor*®.

Fez-se o controlo da injeção por preenchimento dos vasos da íris, da mucosa gengival e da língua. Após completa polimerização do produto procedeu-se à abertura da *bulla timpanica* à lupa e remoção das cócleas que foram sujeitas a corrosão controlada com hidróxido de sódio em sistema de gota-a-gota.

Os moldes vasculares, em alguns casos com a estrutura óssea do modíolo ainda intacta, foram seguidamente lavados com água.

Foram posteriormente sujeitos a metalização com sais de ouro e observados no microscópio electrónico (JEOL JSM-5410), com tensões variáveis de filamento de 10 a 25 Kv. As observações sistemáticas dos vários quadrantes da peça permitiram uma visão de conjunto da estrutura vascular a estudar (Correia, 1984; Goyri-O'Neill, 1984; Pais, 1995; Pais, 1997; Esperança-Pina, 1998; Bettencourt Pires, 2009; Guedes- Silva, 2012)<sup>[83][99-106]</sup>.

As medições do calibre vascular foram realizadas em cada uma das peças com o sistema de medição *SEMAfore*.

Os resultados dos estudos microvasculares, maioritariamente com processamento em microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares foram descritos estudando e analisando a rede microvascular em toda a cóclea, nas estruturas sensorioneurais integrantes da parede interna da cóclea e na parede externa da cóclea.

Com este conjunto de técnicas foi possível obter um modelo tridimensional da microvascularização coclear de grande riqueza de pormenor.



### 3.

## RESULTADOS

Procede-se à apresentação dos resultados obtidos neste estudo ilustrando a morfologia do labirinto ósseo e membranoso.

Seguir-se-á a descrição da microvascularização coclear propriamente dita.

### **3.1. LABIRINTO ÓSSEO ANTERIOR — CÓCLEA**

#### **3.1.1. Parede Externa da Cóclea**

A cóclea constitui a porção anterior do ouvido interno.

No cobaio situa-se no interior da *bulla* temporal.

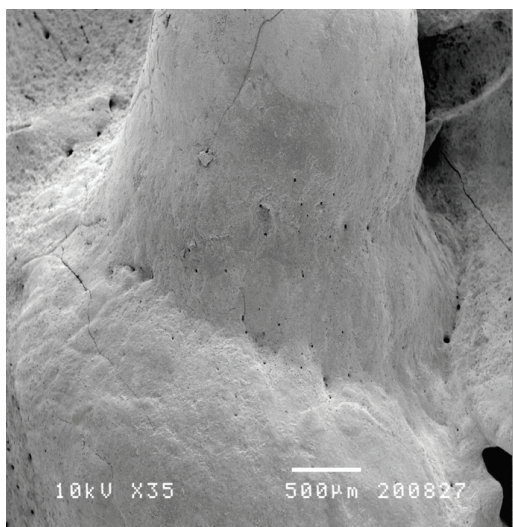
Após abertura desta observa-se de imediato a cóclea óssea, de forma mais alongada que a cóclea humana à custa de um maior eixo ápico-basal.

Em microscopia electrónica de varrimento é possível observar a estrutura e morfologia externa da cóclea em termos tridimensionais, o que desde logo permite observar o grande desenvolvimento da espira basal (FIG. 10), e a diminuição de calibre de cada uma das espiras até ao ápice. No cobaio apresenta três espiras e meia o que explica a maior dimensão, em termos relativos, do eixo ápico-basal (FIG. 11).

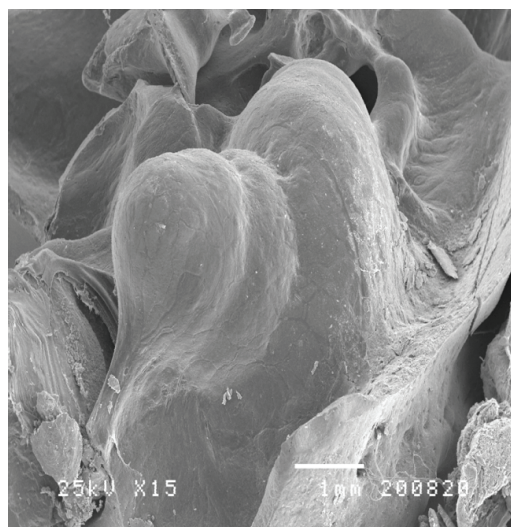
O ducto coclear, ou *canalis spiralis cochlea*, dispõe-se em volta de um eixo imaginário perpendicular à parte petrosa do ápice do rochedo, a columela ou modíolo (FIG. 12).

#### **3.1.2. Lâmina Espiral Óssea**

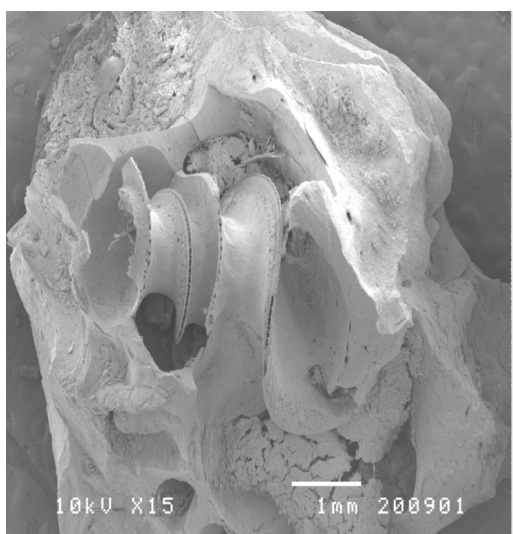
A lâmina espiral óssea é uma lâmina óssea em forma de espira, que percorre a cóclea da espira basal até ao helicotrema.



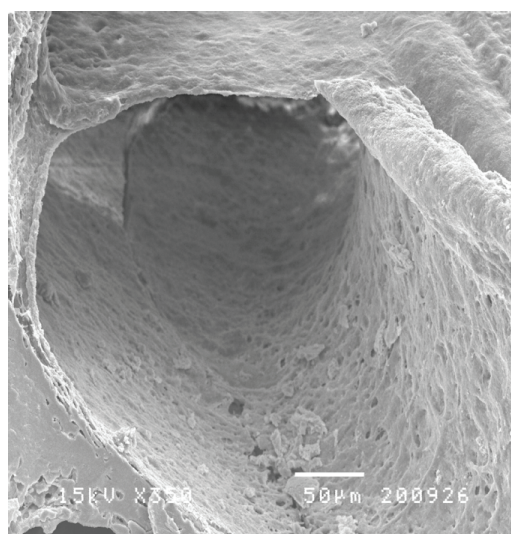
**FIG. 10** Microscopia electrónica de varrimento — 35x. Observação da parede externa e contorno da cóclea óssea observando-se o relevo da transição entre as espiras.



**FIG. 11** Microscopia electrónica de varrimento — 15x. Observação da parede externa e contorno da cóclea óssea com particular destaque para a porção apical



**FIG. 12** Microscopia electrónica de varrimento com corrosão incompleta e micro dissecação da cóclea — 15x. Observação da parede externa e contorno da cóclea óssea com remoção parcial da parede externa e visualização da lâmina espiral



**FIG. 13** Microscopia electrónica de varrimento-corrosão incompleta e micro dissecação da cóclea — 350x. Observação de uma espira da cóclea óssea em corte.

Descreve um trajecto em volta do modíolo em que um dos seus bordos corresponde à parede interna da lâmina de contornos (FIG. 13).

Cria-se uma septação óssea que condiciona duas rampas no interior da cóclea óssea.

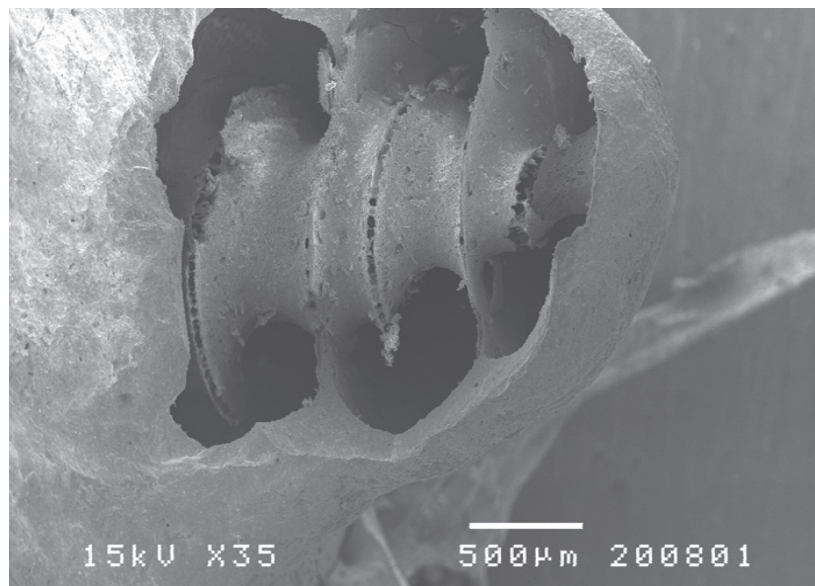
Estas rampas seguem a mesma direcção que a lâmina de contornos na cóclea óssea e estão separadas entre si pela lâmina espiral óssea.

Denomina-se de rampa timpânica a que está em comunicação directa com a janela redonda e é inferior, e de rampa vestibular a que se abre no vestíbulo e é superior.

A lâmina espiral óssea possui um bordo aderente e um bordo livre.

O bordo aderente corresponde à parede interna da lâmina de contornos e confunde-se com esta.

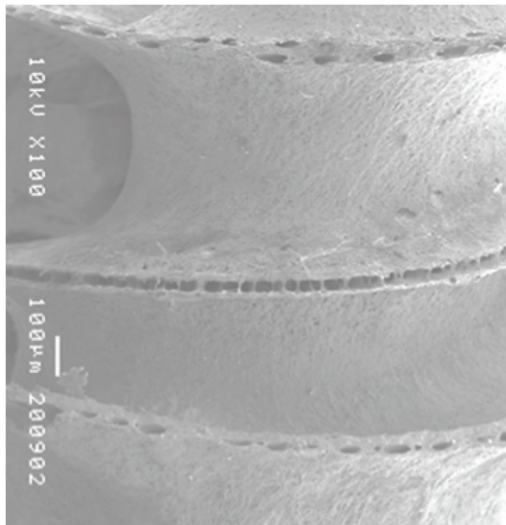
As fibras nervosas que se originam nas células ciliadas entram no bordo livre da lâmina espiral óssea que se apresenta perfurada. A nível deste bordo, numerosos orifícios dão passagem a filetes nervosos, que se abrem no canal espiral de Rosenthal, *canales longitudinales modioli*. (FIG. 14).



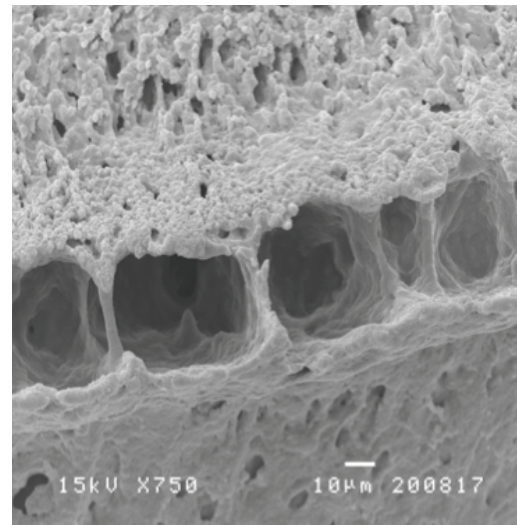
**FIG. 14** Microscopia electrónica de varrimento-corrosão incompleta e micro dissecção da cóclea — 35x. Observação da parede externa e contorno da cóclea óssea com remoção parcial da parede externa e visualização do ápice coclear e da lâmina espiral óssea.

A lâmina espiral óssea no seu bordo livre continua-se pela lâmina espiral membranosa na qual se observa o lábio timpânico que dá inserção à lâmina basilar e o lábio vestibular que dá inserção à lâmina vestibular ou de Reissner.

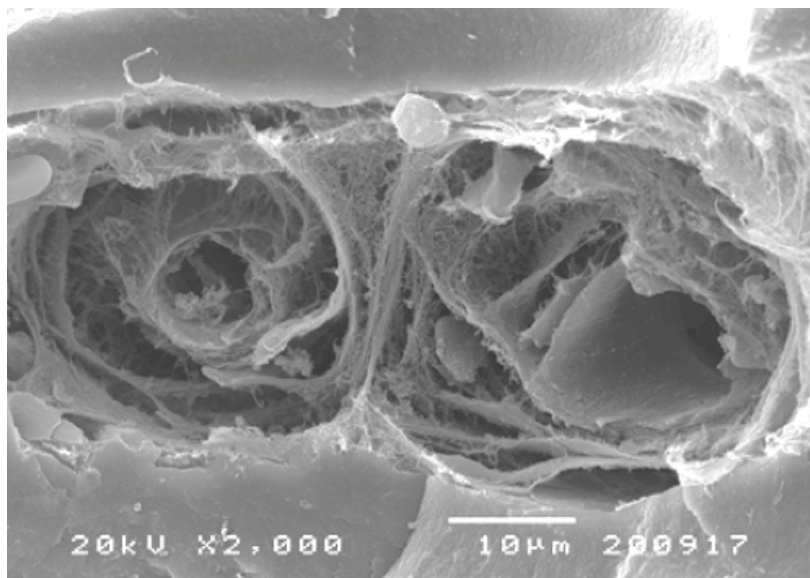




**FIG. 15** Microscopia electrónica de varrimento-corrosão incompleta e micro dissecção da cóclea — 100x. Observação da lâmina espiral que se apresenta perfurada para acesso aos canais longitudinais modioli. As fibras nervosas que se originam nas células ciliadas penetram no bordo livre da lâmina espiral.



**FIG. 16** Microscopia electrónica de varrimento-corrosão incompleta e micro dissecção da cóclea — 750x. Observação dos orifícios de entrada dos *canali longitudinales modioli* com distribuição radiária relativamente ao eixo do modiolo.



**FIG. 17** Microscopia electrónica de varrimento sem corrosão e com micro dissecção da cóclea — 2000x. Observação com grande detalhe dos canalículos arteriais da lâmina espiral, observando-se o pormenor do endotélio vascular em modo tridimensional.

Estas membranas condicionam em cada uma das espiras duas rampas, a rampa inferior ou timpânica e a rampa superior ou vestibular as quais comunicam entre si no ápice coclear pelo helicotrema, também denominado de *rostrum* ou *hamulus da lamina spiralis*.

A lâmina espiral óssea é constituída por duas lâminas ósseas distintas, superior e inferior, estas estão ligadas entre si por trabéculas ósseas, formando um sistema canalicular que se inicia na parede externa do canal espiral de Rosenthal. Este sistema canalicular dá passagem a filetes nervosos.

O estudo da lâmina espiral óssea, tal como observada pela técnica de microscopia electrónica de varrimento, permite observar com grande detalhe os canais de entradas das fibras aferentes do gânglio espiral que têm a sua origem nas células ciliadas.

O bordo livre da lâmina espiral óssea apresenta numerosos orifícios (FIG. 15 e 16), que dão passagem a filetes nervosos que convergem para o canal espiral de Rosenthal através de canaliculos longitudinais, denominados de *canali longitudinali modioli*.

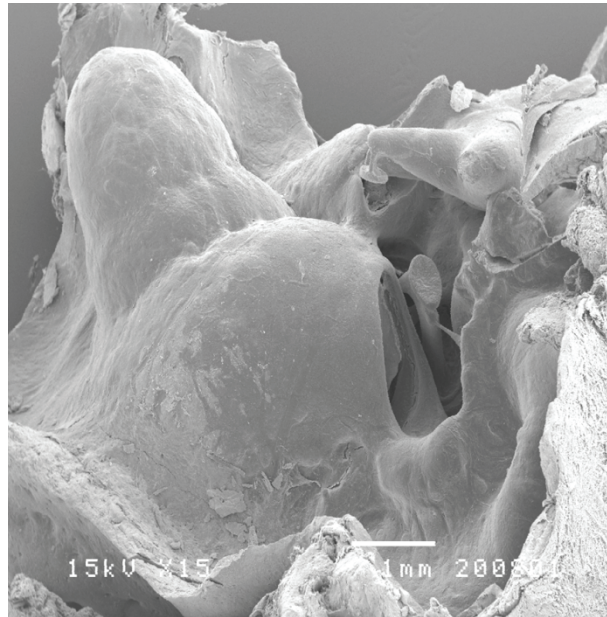
A lâmina espiral óssea dá passagem não só a filetes nervosos que promovem o contacto entre as células ciliadas e o gânglio espiral de Corti mas também a arteríolas pré-capilares e a capilares.

Se se proceder à observação quando da dissecção da lâmina espiral óssea podem observar-se os canaliculos arteriais no bordo livre da lâmina espiral óssea, com disposição linear ao longo de toda a lâmina espiral óssea, convergindo estes, de modo radiário, para a porção central do modíolo (FIG. 17).

A lâmina espiral membranosa prolonga-se pelo lábio inferior ou timpânico.

### 3.1.3. Espira Basal da Cóclea

A espira basal da cóclea é a mais desenvolvida.



**FIG. 18** Microscopia electrónica de varrimento — 15×.  
Espira basal e região das janelas observando-se a cadeia ossicular  
desarticulada para melhor visualização da supra-estrutura do estribo.

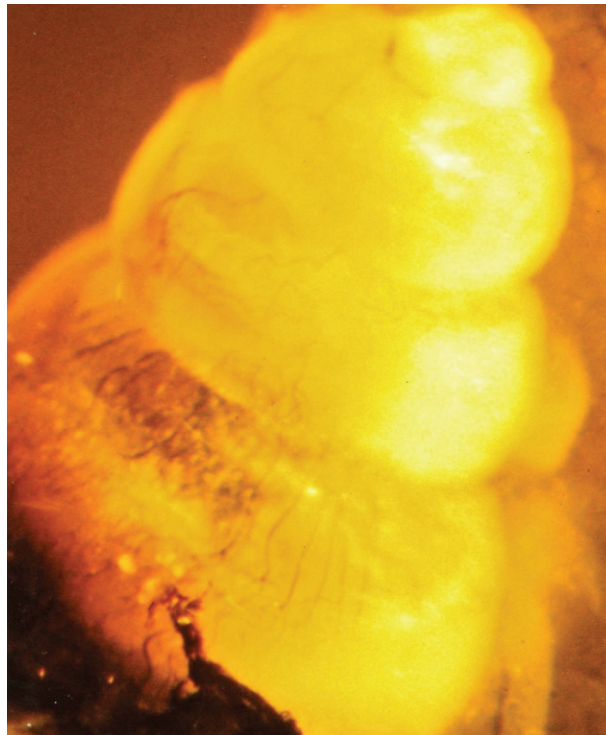
Nela, observam-se duas fossetas: a fosseta da janela redonda ou janela da cóclea que comunica com a rampa timpânica e a fosseta da janela oval ou janela do vestíbulo que se relaciona com a platina do estribo dando acesso à rampa vestibular (FIG. 18).

### 3.2. LABIRINTO MEMBRANOSO ANTERIOR

O labirinto membranoso é constituído por um longo canal membranoso que se desenvolve no interior da cóclea óssea, a cóclea membranosa (FIG. 19).

A sua conformação externa é de certo modo condicionada pela estrutura óssea no interior da qual se forma.

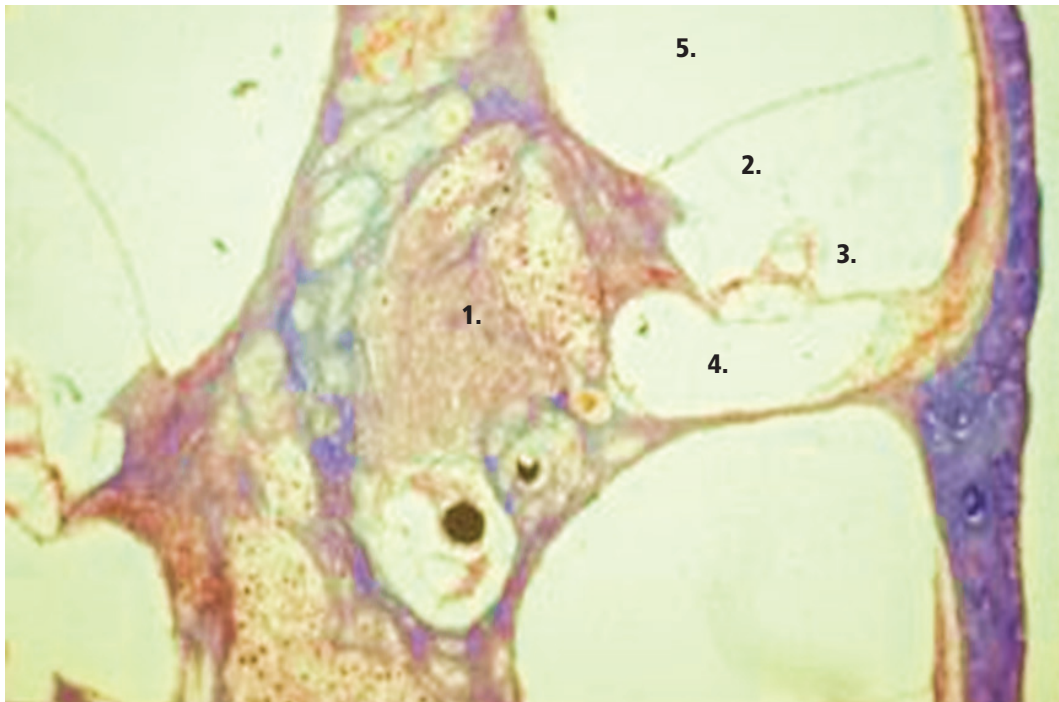
A sua orientação, disposição e contornos das suas espiras são em tudo semelhantes à superfície óssea com a qual se relacionam.



**FIG. 19** Técnica de diafanização — 10x.  
Fotografia com lupa estereoscópica observando-se a cóclea membranosa.

O labirinto membranoso anterior ou cóclea membranosa, está separado do labirinto ósseo ou cóclea óssea pelo espaço perilinfático, onde circula a perilinfa.





**FIG. 20** Técnica histológica com coloração tricrômico de Masson — 100x.

Cortes perpendiculares ao eixo do modíolo, observando-se com detalhe a cóclea membranosa  
Observação do gânglio espiral, do ducto coclear e das rampas timpânica e vestibular  
em cada uma das espiras.

1. Gânglio espiral, 2. Ducto Coclear, 3. Órgão espiral de Corti, 4. Rampa Timpânica, 5. Rampa Vestibular

### 3.2.1. Ducto Coclear

Em cada uma das espiras, observa-se o ducto coclear ou ducto coclear, onde circula a endolinfa e onde se situam as células sensoriais do órgão espiral de Corti (**FIG. 20**).

O ducto coclear foi observado com grande riqueza de pormenor na sua constituição pela sua grande importância na fisiologia da audição. A característica única da função coclear é o facto de que os factores mecânicos intrínsecos modulam a vibração acústica inicial previamente à estimulação do nervo auditivo.

É limitado inferiormente pela lâmina basilar, superiormente pela lâmina vestibular ou de Reissner e lateralmente, pela estria vascular.

### 3.2.1.1. Lâmina Basilar

A membrana ou lâmina basilar prolonga o bordo livre da lâmina espiral óssea e o lábio timpânico do sulco espiral interno. Esta vibra da base para o ápice em resposta ao som.

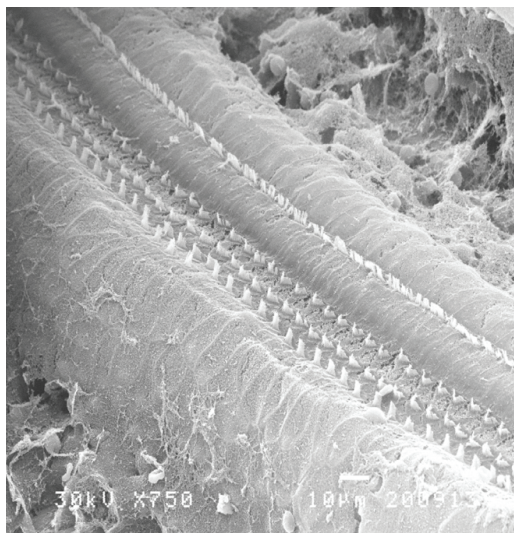
Na lâmina basilar, distinguem-se a porção interna, mais lisa, a zona arqueada ou *arcuata* entre o modíolo e o pilar externo do túnel de Corti, e a porção externa, pectínea ou *pectinealis*, entre o pilar externo do túnel do Corti e a estria vascular a que se segue o ligamento espiral e que limitam externamente o ducto coclear.

### 3.2.1.2. Órgão Espiral de Corti

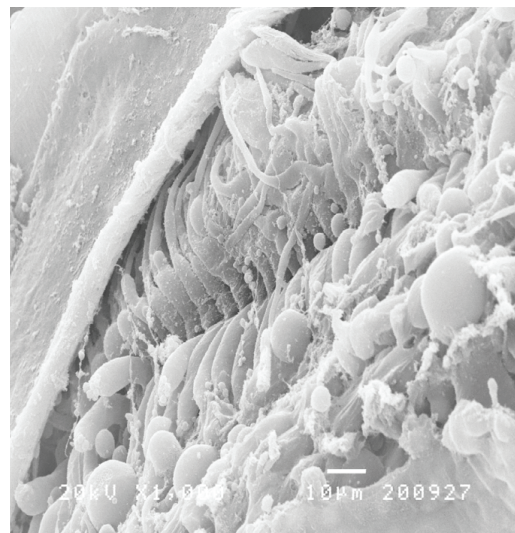
O órgão espiral de Corti, zona mais nobre de toda esta arquitectura coclear, está sobre a lâmina basilar. Neste, a camada de células ciliadas internas e as camadas de células ciliadas externas (FIG. 21), células sensoriais da cóclea, delimitam o túnel de Corti.

Subjacente a este, observam-se as células de sustentação das células sensoriais (FIG. 22).

As células de sustentação são as células limitantes internas, as células falângicas internas e externas, as células de Deiters, Hensen, Claudius e Bottcher.



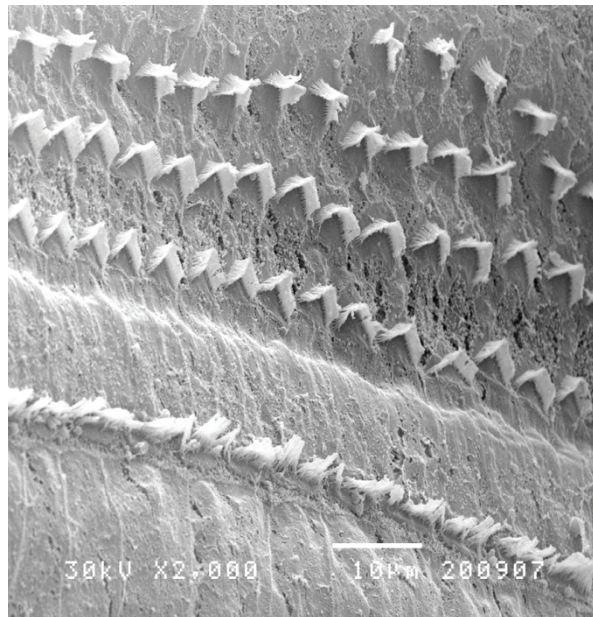
**FIG. 21** Microscopia electrónica de varrimento pós microdissecção da cóclea — 750x. Observa-se a disposição relativamente regular das fileiras de células ciliadas no Cobaio.



**FIG. 22** Microscopia electrónica de varrimento — 1000x. Micro dissecção das células de sustentação do Órgão de Corti.

Estas células têm não só função de sustentação, mas também função de nutrição.

As células ciliadas distinguem-se em dois grupos morfológicamente distintos, as células ciliadas internas que se dispõem numa única fileira ao longo de toda a cóclea e limitam internamente o túnel de Corti e as células ciliadas externas dispostas em três ou mais fileiras, (FIG. 23) que limitam externamente o túnel de Corti.



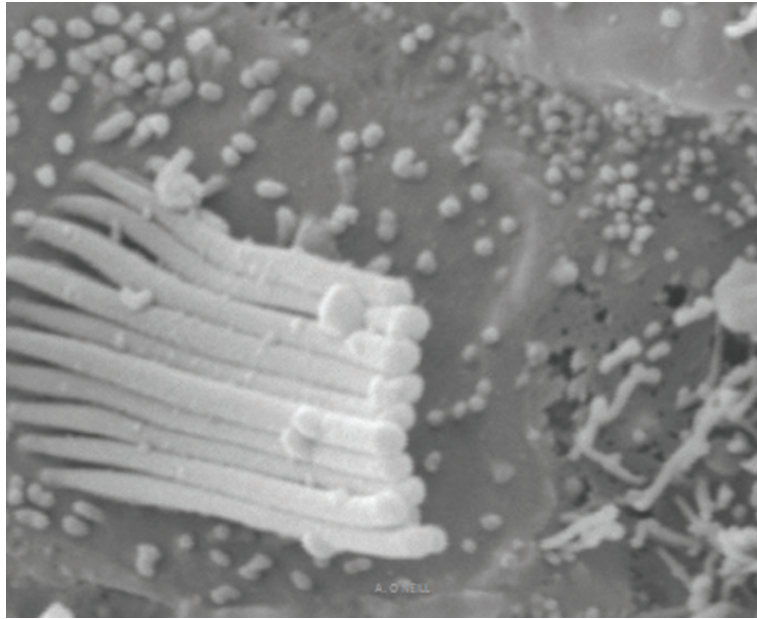
**FIG. 23** Microscopia electrónica de varrimento — Micro dissecção da cóclea — 2000x.  
Observação das células ciliadas internas e externas dispostas em fileiras.

Denominam-se de células ciliadas porque da superfície superior de cada uma destas células emergem finos filamentos semelhantes a cílios, de maior complexidade no caso das células ciliadas externas e de menor complexidade no caso das células ciliadas internas.

As células ciliadas actuam como transdutores biológicos e têm características morfológicas muito distintas, sendo que as células ciliadas externas estão intimamente relacionadas com a membrana tectória através dos seus estereocílios.

#### 3.2.1.2.1 Células Ciliadas Internas

As células ciliadas internas, apresentam estereocílios que se dispõem de forma linear, paralelamente ao eixo do ducto coclear (FIG. 24).



**FIG. 24** Microscopia electrónica de varrimento — 10 000x.  
Células ciliadas internas e características dos seus estereocílios.

Os estereocílios das células ciliadas internas dispõem-se em palissada.

Em cada célula, os estereocílios são em número não inferior a 10 e dispõem-se de modo linear em cada uma das espiras.

#### 3.2.1.2.2 Células Ciliadas Externas

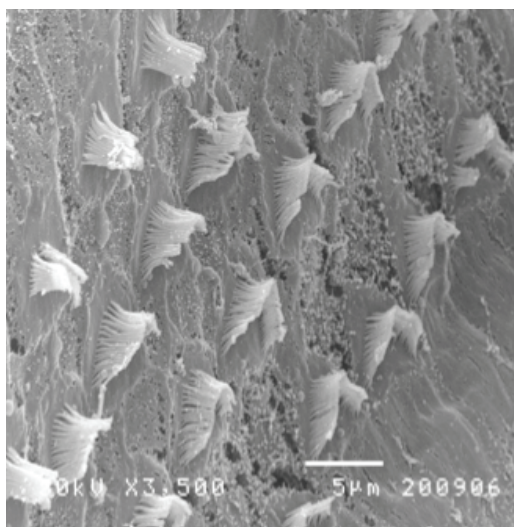
As células ciliadas externas estão dispostas, no Homem como no Cobaio, em três a cinco fileiras (**FIG. 25**), sendo a sua distribuição mais regular no Cobaio.

A disposição dos seus estereocílios é complexa simulando um V ou W, sendo em número de 38 a 40 em cada célula ciliada externa, dispondo-se por vezes na própria célula em mais de uma fileira.

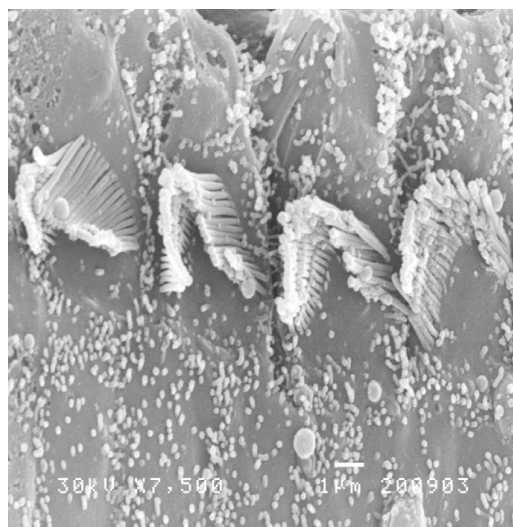
Da presente observação é patente a sua disposição em dupla palissada formando um angulo diedro agudo cujo vértice é centrípeto relativamente ao eixo do modíolo (**FIG. 26**).

Cada um dos lados destes ângulos diedros tem igual número de estereocílios, entre 18 e 20  $\mu\text{m}$ .

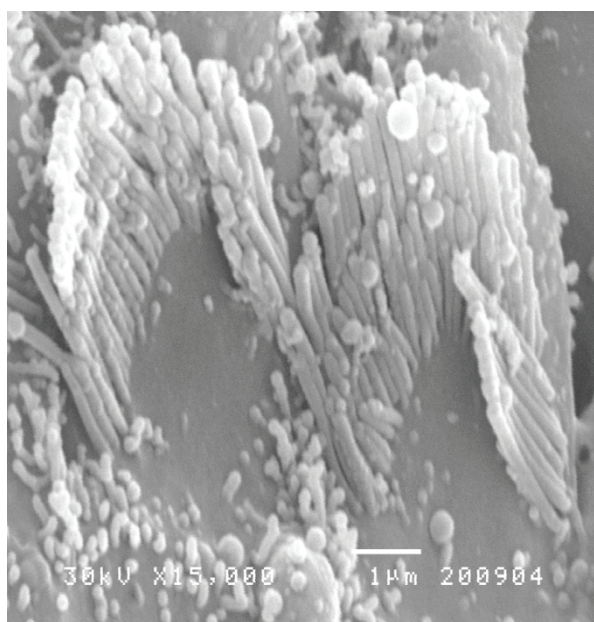




**FIG. 25** Microscopia electrónica de varrimento — 3500x.  
Células ciliadas externas cujos estereocílios se dispõem em V ou W.



**FIG. 26** Microscopia electrónica de varrimento — 7500x.  
Células ciliadas externas.



**FIG. 27** Microscopia electrónica de varrimento — 15 000x.  
Células ciliadas externas observando-se a complexidade de distribuição dos seus estereocílios.

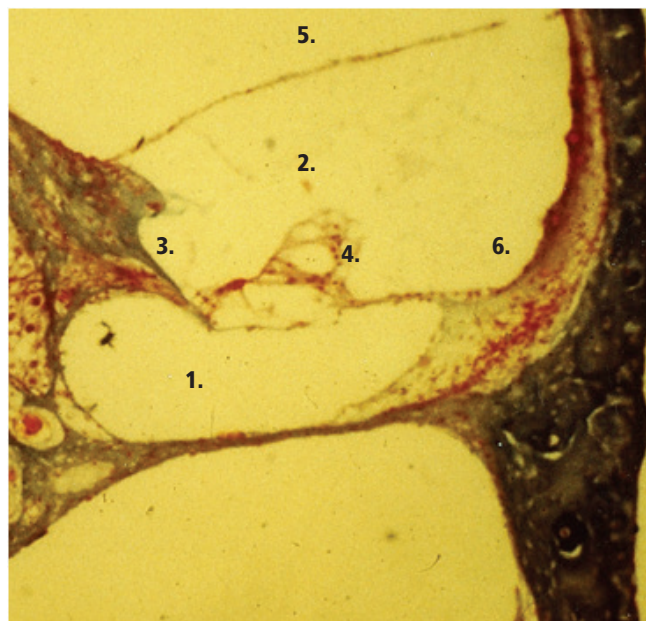
Os estereocílios surgem como evaginações da membrana celular.

No cobaio observou-se que cada estereocílio possui um diâmetro médio entre 0,2  $\mu\text{m}$  e 0,4  $\mu\text{m}$ , com maior número de estereocílios na espira basal do que no ápice da cóclea (FIG. 27).

A fragilidade destes cílios é tal que a estimulação acústica excessiva poderá levar a uma alteração importante da sua morfologia e inclusive à sua destruição.

### 3.2.1.3. Lâmina Vestibular ou de Reissner

A lâmina vestibular ou de Reissner limita superiormente o ducto coclear, separando-o da rampa vestibular.



**FIG. 28** Técnica histológica-Tricrômico de Masson — 100x.

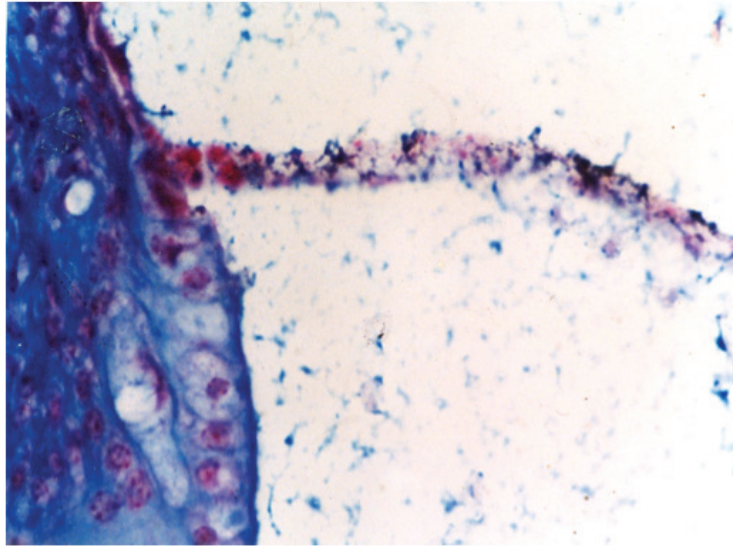
Observação de uma espira da cóclea.

1. Rampa timpânica, 2. Ducto coclear, 3. Lâmina basilar, 4. Órgão espiral de Corti,  
5. Lâmina Vestibular ou de Reissner, 6. Ligamento Espiral e Estria Vascular

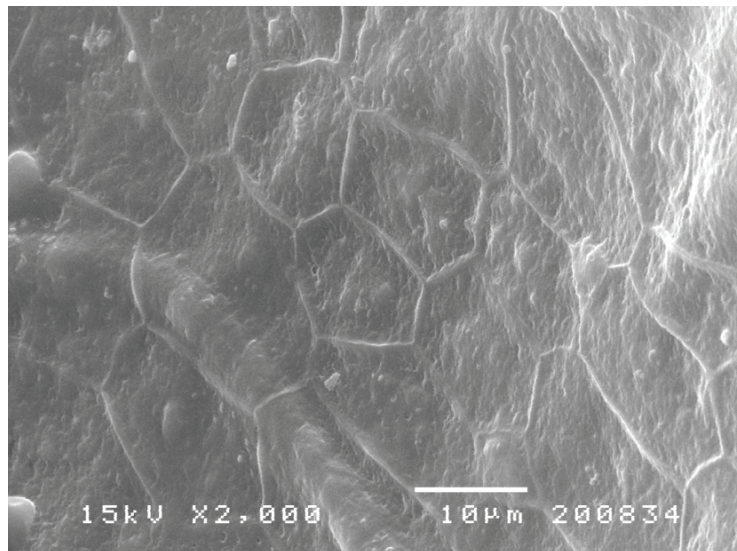
A lâmina vestibular ou de Reissner insere-se no lábio vestibular da lâmina espiral óssea e dirige-se para a porção superior da parede externa do ducto coclear (FIG. 28).

É formada por epitélio pavimentoso com características diferentes na sua metade inferior, em relação com o ducto coclear e a endolinfa, e na sua metade superior,

em relação com a rampa vestibular onde circula a perilinfa, entre ambas situa-se uma lâmina basal (FIG. 29 e 30).



**FIG. 29** Técnica histológica-Tricrômico de Masson — 150x.  
Origem e trajecto da lâmina vestibular ou de Reissner.



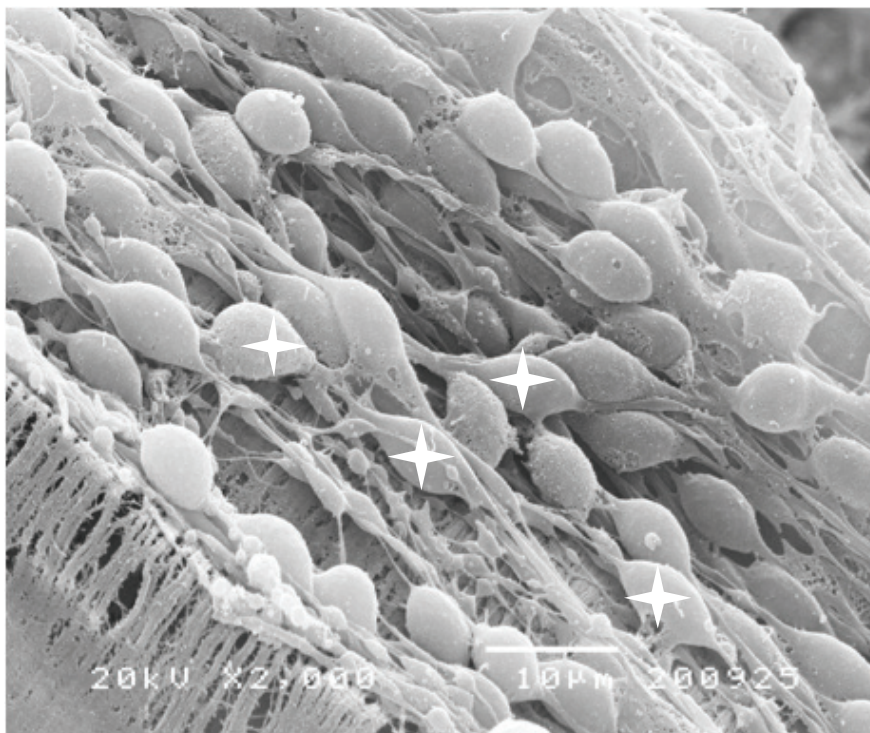
**FIG. 30** Técnica de microscopia electrónica de varrimento — 2000x.  
Observação da lâmina vestibular ou de Reissner pela sua face vestibular.



### 3.2.2. Gânglio Espiral de Corti

O gânglio espiral de Corti constitui pela reunião dos seus ramos o nervo coclear, o protoneurónio da via coclear, encontrando-se disposto ao longo do modíolo no interior do canal espiral de Rosenthal.

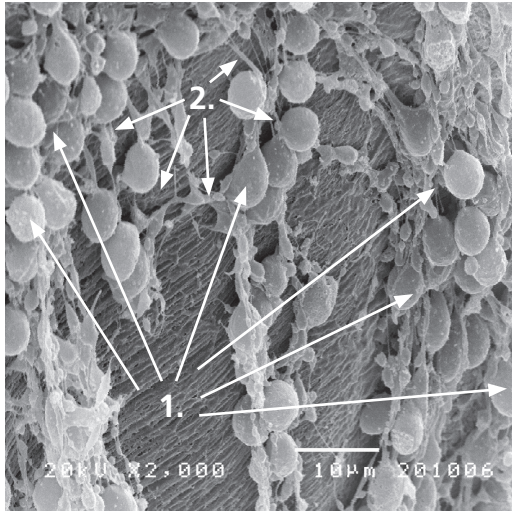
Os corpos celulares das células bipolares que constituem o gânglio espiral de Corti são observáveis em microscopia electrónica de varrimento (FIG. 31)



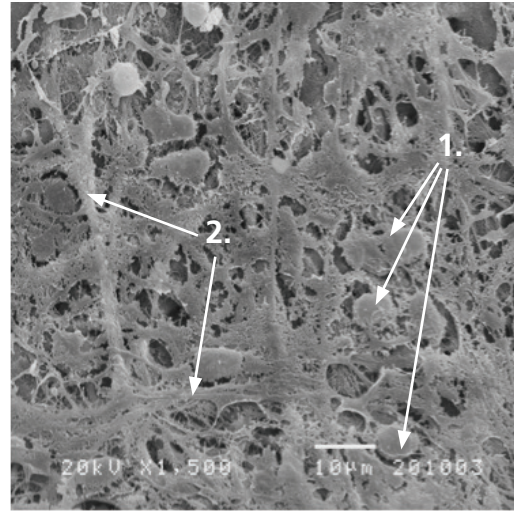
**FIG. 31** Microscopia electrónica de varrimento-crio fractura e micro dissecção da cóclea — 2000x. Observação do interior do modíolo pós-dissecção estando assinalados os corpos celulares (estrela) do gânglio espiral.



Estas células bipolares cujo corpo celular ou pericário tem uma forma elíptica ou amendoada apresentam dois tipos de prolongamentos (FIG. 32 e 33).



**FIG. 32** Microscopia electrónica de varrimento-corrosão incompleta e micro dissecção da cóclea — 2000x.  
1. Corpos celulares ganglionares  
2. Prolongamentos intercelulares



**FIG. 33** Microscopia electrónica de varrimento-corrosão incompleta e microdissecção da cóclea — 1,500x.  
1. Corpos celulares ganglionares  
2. Prolongamentos axonais

Os prolongamentos maiores que se originam do corpo celular e pela sua reunião constituem o nervo coclear e os prolongamentos axonais, de menores dimensões, que fazem sinapse com as células ciliadas do órgão espiral de Corti.

Estas células bipolares são neurónios sensoriais à semelhança de outros neurónios sensoriais como o olfactivo, visual ou vestibular.

O modíolo contém as células do gânglio espiral de Corti, com o seu corpo celular e os seus prolongamentos, constituindo uma malha em que se evidenciam os pericários (FIG 33).

### 3.3. A CÓCLEA E A ORIGEM DA SUA VASCULARIZAÇÃO ARTERIAL

#### 3.3.1. Vascularização arterial da parede interna da Cóclea Membranosa

A vascularização do ouvido interno, no cobaio como no homem, faz-se através dos ramos de divisão da artéria auditiva interna ou labiríntica.

A artéria labiríntica origina-se como ramo colateral da artéria cerebelosa ântero-inferior a qual tem origem na artéria basilar ou na artéria vertebral.

Embora no homem a artéria auditiva interna possa também destacar-se da artéria basilar e até da artéria vertebral, no cobaio em todos os casos estudados a sua origem verificou-se sempre na artéria cerebelosa ântero-inferior.

A artéria labiríntica, ao passar abaixo do meato auditivo interno, divide-se na artéria vestibular anterior e na artéria coclear comum.

A artéria vestibular anterior dirige-se para o nervo vestibular, emite *vasa nervorum* para este nervo e vasculariza o utrículo e os canais semicirculares.

A artéria coclear comum origina dois ramos principais, a artéria vestibulo-coclear ou vestibular posterior no cobaio, a qual se destaca junto à espira basal da cóclea e a artéria coclear, como ramo terminal, que passa a denominar-se de artéria modiolar ou espiralada, após entrar no modíolo.

Toda a sistematização da microvascularização arterial será feita segundo a classificação proposta por Esperança Pina, para a microvascularização em geral (Esperança Pina, 1980)<sup>[106]</sup> (FIG. 34).

**Artérias de pequeno calibre**, com calibres superiores a 200  $\mu\text{m}$ .

**Arteriolas de 1.<sup>a</sup> ordem**, com calibres compreendidos entre 200 e 100  $\mu\text{m}$ .

**Arteriolas de 2.<sup>a</sup> ordem**, com calibres compreendidos entre 100 e 30  $\mu\text{m}$ .

**Arteriolas pré-capilares**, arteriolas terminais ou metarteriolas, com calibres compreendidos entre 30  $\mu\text{m}$  e o calibre dos canais preferenciais e capilares.

**Canais preferenciais**, com calibres compreendidos entre 10 e 15  $\mu\text{m}$ .

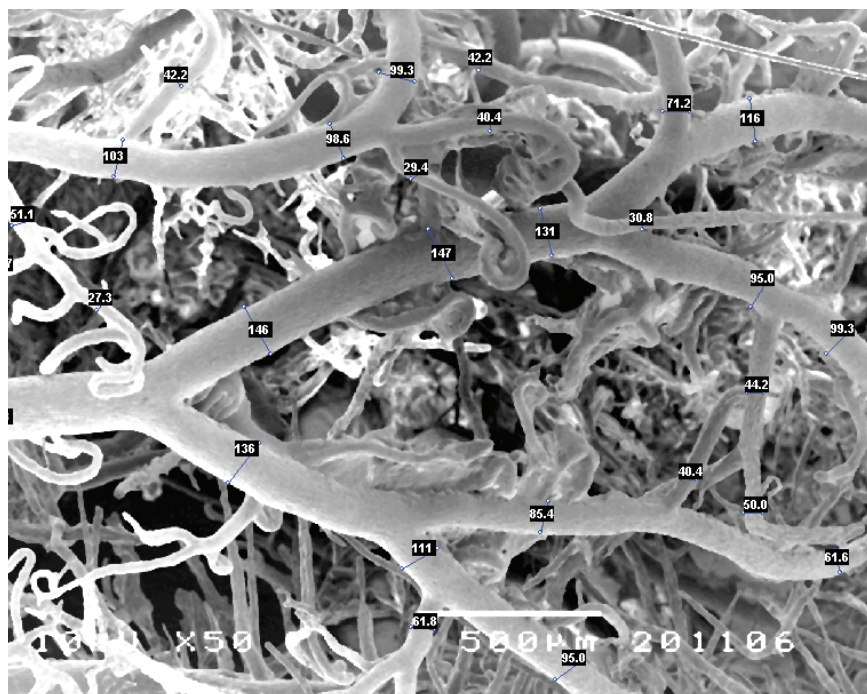
**Capilares**, com calibres compreendidos entre 5 e 12  $\mu\text{m}$ .

**Vénulas pós-capilares**, com calibres compreendidos entre o calibre dos capilares e 30  $\mu\text{m}$ .

**Vénulas de 2.<sup>a</sup> ordem**, com calibres compreendidos entre 30 e 100  $\mu\text{m}$ .

**Vénulas de 1.<sup>a</sup> ordem**, com calibres compreendidos entre 100 e 200  $\mu\text{m}$ .

**Anastomoses arteriólo-venulares**, com calibre entre 20 e 30  $\mu\text{m}$ .

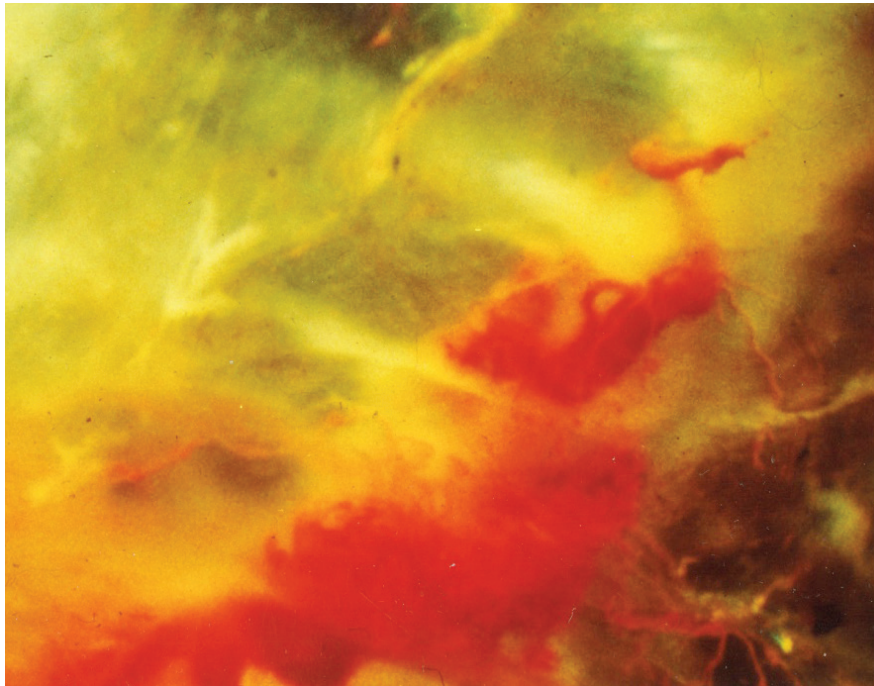


**FIG. 34** Microscopia electrónica de varrimento em moldes microvasculares, ampliação 50x — Medição por SEMAfor dos calibres arteriais. Arteriola de 1.<sup>a</sup> ordem, com calibre de 183  $\mu\text{m}$  dividindo-se em arborização dicotômica em vasos arteriulares de 2.<sup>a</sup> ordem com 103  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.2. Artéria Modiolar Espiralada

A artéria modiolar espiralada é o ramo terminal da artéria coclear.

A artéria modiolar ascende no modíolo promovendo através dos seus ramos colaterais e dos seus ramos terminais a microvascularização coclear, numa vascularização de órgão de tipo terminal (FIG. 35).



**FIG. 35** Técnica de diafanização pós injeção vascular, fotografia à lupa estereoscópica — 65x. Observa-se o trajecto da artéria espiralada em volta do modíolo.

Esta artéria origina vários ramos colaterais, que são mais numerosos na espira basal, e divide-se, já no ápice da cóclea junto ao helicotrema, em dois a quatro ramos terminais.

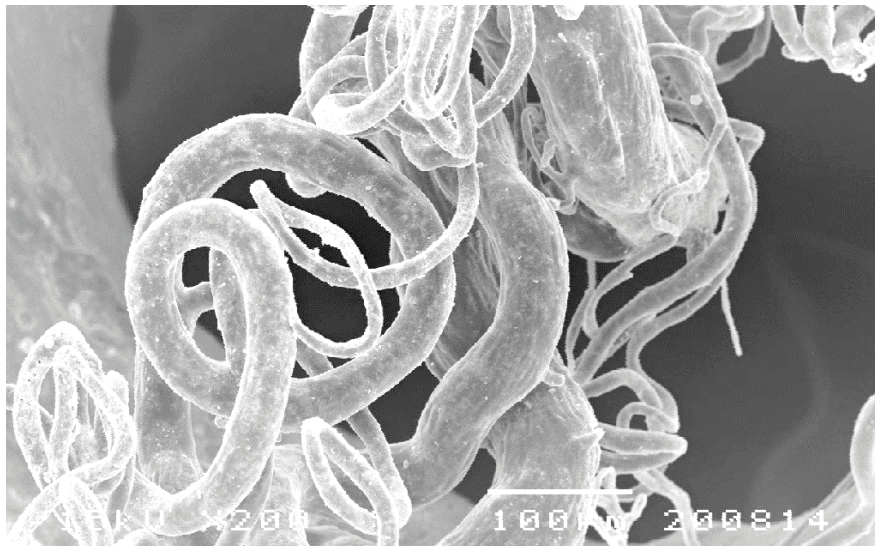
A artéria modiolar espiralada é uma artéria de tipo flexuoso na sua morfologia, sendo que ao longo do seu trajecto no interior do modíolo, em íntima relação com este, percorre as várias espiras com um trajecto adaptado à morfologia coclear (FIG 36).

A flexuosidade do seu trajecto é explicável pela necessidade de diminuir as pulsações e pressão arterial na circulação arterial da cóclea, evitando qualquer traumatismo



às estruturas do órgão espiral de Corti e proporcionando simultaneamente uma vascularização arterial otimizada das estruturas sensorineurais de proximidade.

O facto de se tratar de uma artéria anatomica e fisiologicamente terminal, implica que a vascularização arterial para as estruturas sensorineurais da cóclea depende desta artéria, não havendo anastomoses a nível do modíolo que possam restabelecer a vascularização arterial se em presença de isquémia, trombose arterial ou secção quando por exemplo de traumatismo do rochedo, o que confere grande importância ao seu estado ao longo de todo o seu trajecto.



**FIG. 36** Microscopia electrónica de varrimento em moldes microvasculares — 200x. Observação do trajecto flexuoso da artéria modiolar espiralada com calibre de 80 µm.

Em termos hemodinâmicos, é importante ter presente a lei de Stahl ao estudar a morfologia da artéria labiríntica, segundo a qual, de cada vez que uma artéria descreve uma curvatura, se produz no ponto máximo de curvatura, uma diminuição de calibre, com consequente diminuição de pressão, representando um mecanismo que no caso da microvascularização coclear tende a equalizar a perfusão arterial ao longo de toda a cóclea.

Uma característica constante das paredes das paredes das artérias quando analisadas em microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares são os *nuclei imprinting* (FIG 37) provocados pela presença de células endoteliais na parede vascular, observáveis após corrosão, os quais se apresentam com aspeto fusiformes.



**FIG. 37** Técnica de microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares — 1000x. Observação de um segmento da artéria modiolar espiralada observando-se na sua parede as impressões fusiformes dos núcleos das células endoteliais.

### Trajecto

A artéria modiolar espiralada apresenta um trajecto em espiral à volta do modíolo em íntima relação internamente com a origem do nervo coclear e externamente com o gânglio espiral de Corti.

Em cada uma das espiras, a artéria espiralada percorre o ângulo formado pela lâmina espiral óssea e a parede interna da espira.

No seu trajecto extremamente flexuoso, apresenta ansas vasculares que têm também como função aumentar a superfície vascular e favorecer o aumento da actividade metabólica das estruturas da cóclea membranosa adjacentes à lâmina espiral óssea.

### Calibre

A artéria modiolar apresenta um calibre que, no seu início, tem valores entre 80 e 100 µm. Ao longo do seu trajecto verificou-se de modo constante uma redução gradual de calibre em cada uma das espiras, por emissão de ramos colaterais, sendo que o calibre da artéria na base da cóclea apresenta um valor que diminui gradualmente até ao ápice.

### 3.3.2.1. Artéria Modiolar Espiralada e os seus ramos colaterais

A artéria modiolar origina em todo o seu trajecto ramos colaterais, cujo número diminui em valor absoluto da base para o ápice.

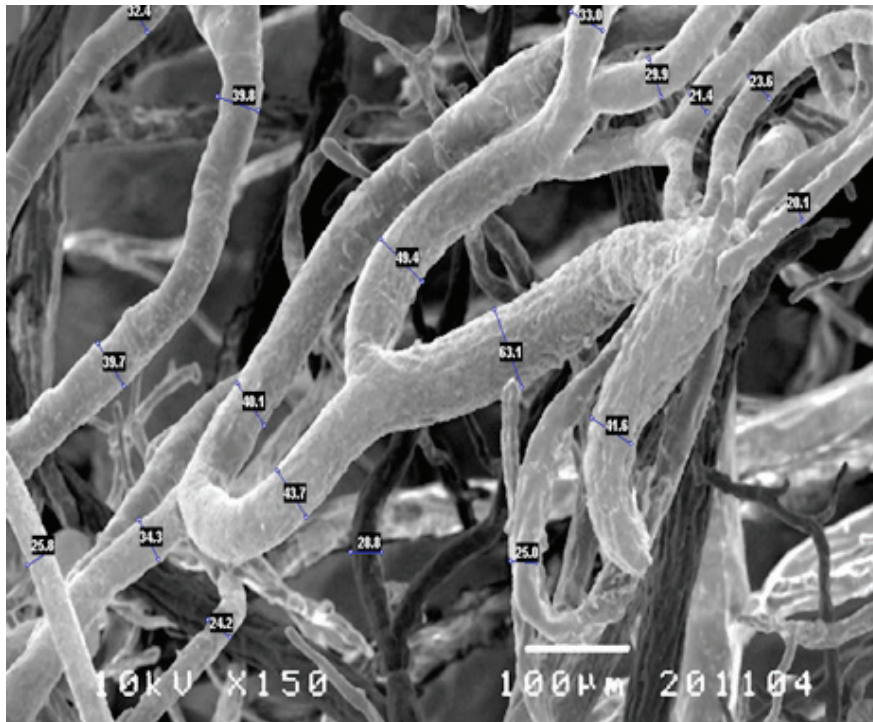
São arteríolas de 2.º ordem com calibre entre 40 e 12  $\mu\text{m}$  que se dividem em dois grupos principais:

- ✦ **Arteríolas radiárias internas** – arteríolas de trajecto flexuoso que caminham junto às estruturas sensorioneurais da parede interna da cóclea, junto ao lábio timpânico da lâmina espiral óssea e na parede do próprio modíolo, que se relacionam intimamente com este e que, através dos seus ramos se distribuem à parede interna da cóclea (FIG. 38 e 39).



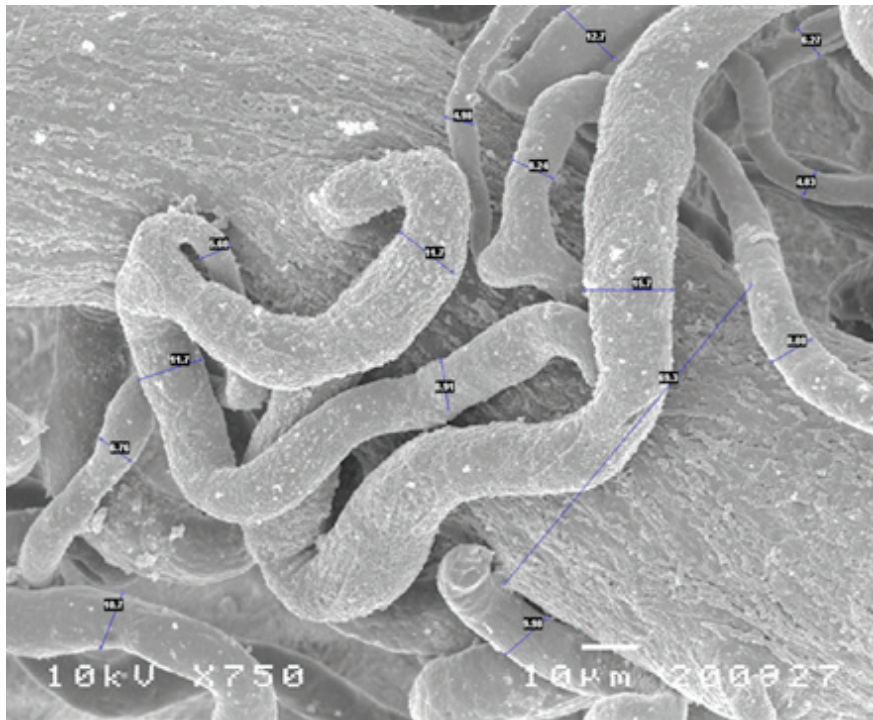
**FIG. 38** Microscopia electrónica de varrimento em moldes microvasculares — 150x.  
Arteríolas radiárias internas.



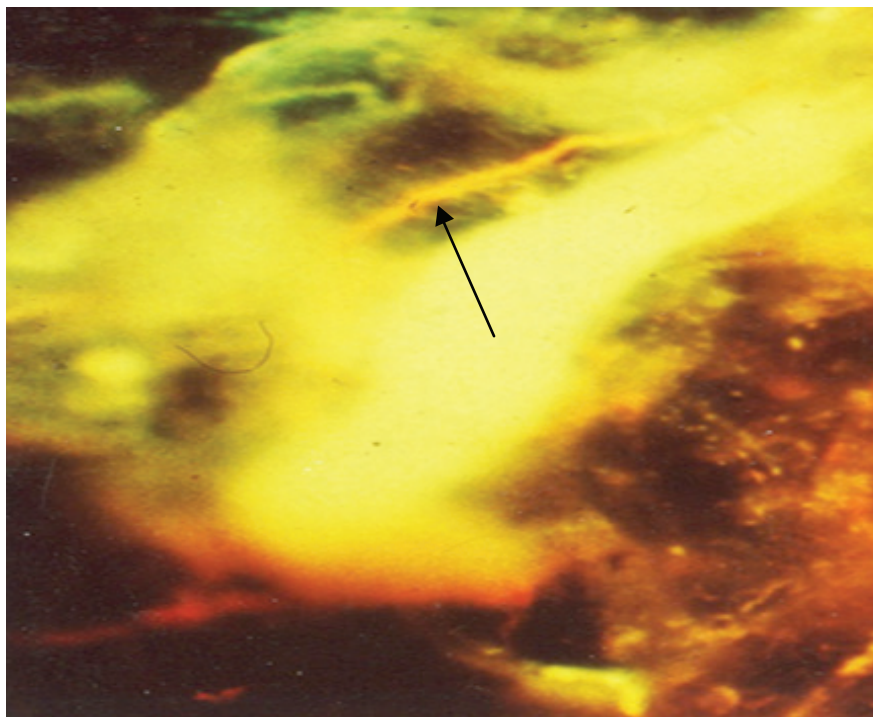


**FIG. 39** Microscopia electrónica de varrimento em moldes microvasculares — 150×. Arteriolas radiárias internas e medição de calibre com aplicação do sistema *SEMAfore*.

- ✦ **Arteriolas radiárias externas** – arteriolas de trajecto rectilíneo que caminham na face superior da lâmina vestibular e se destinam à vascularização arterial das estruturas da parede externa da cóclea, nomeadamente do ligamento espiral e da estria vascular.
- ✦ **Outros ramos colaterais** – vascularizam a parede da própria artéria, *vasa vasorum arteriais* (FIG. 40) e arteriolas que se dirigem para a bainha do nervo coclear, os *vasa nervorum*, contribuindo para a sua vascularização arterial (FIG. 41).



**FIG. 40** Microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares — 750x.  
Observa-se a emergência de arteríolas radiárias internas e de *vasa vasorum* para a parede da artéria modiolar.

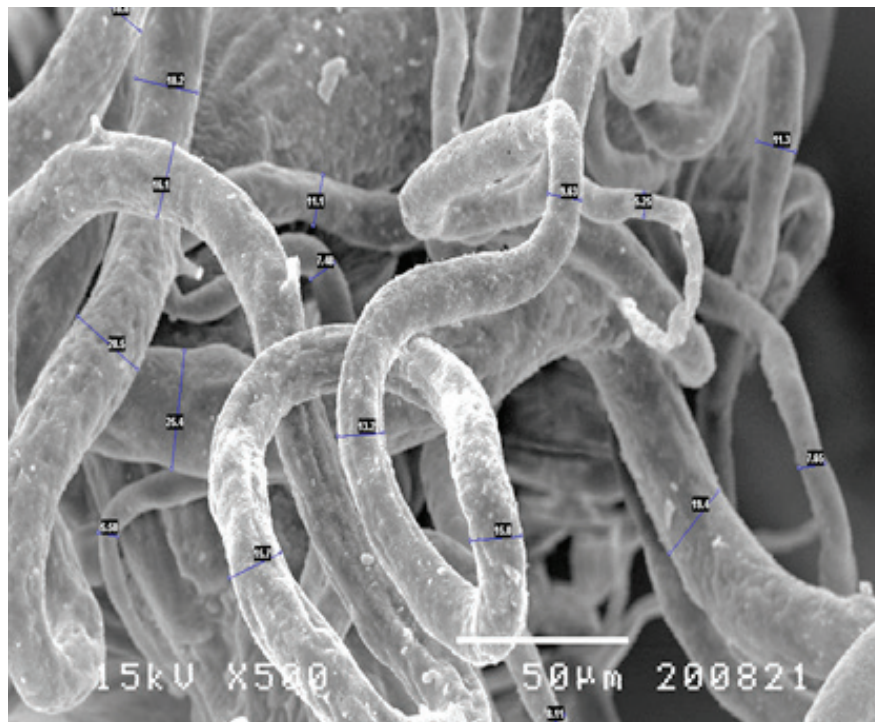


**FIG. 41** Técnica de diafanização — 70x.  
*Vasa nervorum* injectados a vermelho, para vascularizar nervo coclear

Os *vasa vasorum* arteriais e os *vasa nervorum* são arteríolas pré-capilares que posteriormente se dividem numa rede capilar para vascularizarem, respectivamente, a bainha das artérias e do nervo coclear.

#### 3.3.2.1.1. Arteríolas Radiárias Internas

As arteríolas radiárias internas constituem o grupo de colaterais da artéria espiralada que se distribui à lâmina espiral óssea e que tem como território de vascularização as estruturas sensorineurais da parede interna da cóclea (FIG. 43).



**FIG. 43** Microscopia electrónica de varrimento em moldes microvasculares — 500x.  
 Rede vascular de arteríolas radiárias internas, constituindo rede espiral interna de aspecto sinuoso e enovelado com diâmetros entre 10.3 e 18 µm.

#### Origem

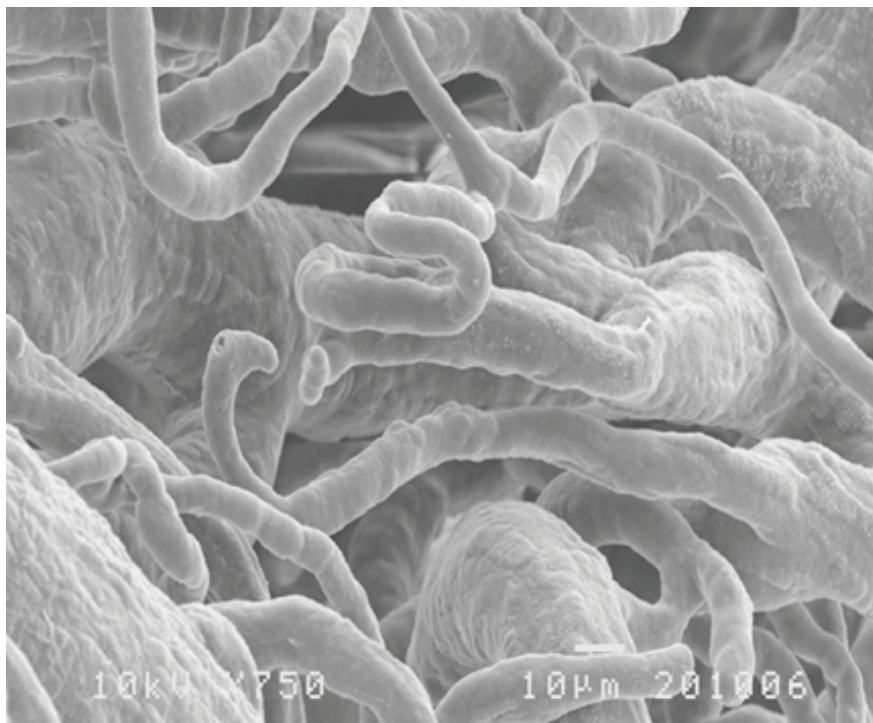
As arteríolas radiárias internas originam-se no flanco da artéria modiolar espiralada. Contam-se dez a doze em cada espira, extraordinariamente flexuosas desde a sua origem.



### Calibre

Neste seu trajecto com inúmeras ansas vasculares, têm um calibre que se situa por vezes acima dos 20  $\mu\text{m}$  na espira basal e na espira seguinte apresentam valores inferiores, entre 12 e 20  $\mu\text{m}$ , decrescendo estes valores progressivamente até ao àpex da cóclea.

Algumas das arteríolas radiárias internas apresentam trajecto mais rectilíneo e ascendem somente na parede interna do modíolo, com trajecto algo sinuoso mas sem formar verdadeiras ansas vasculares.



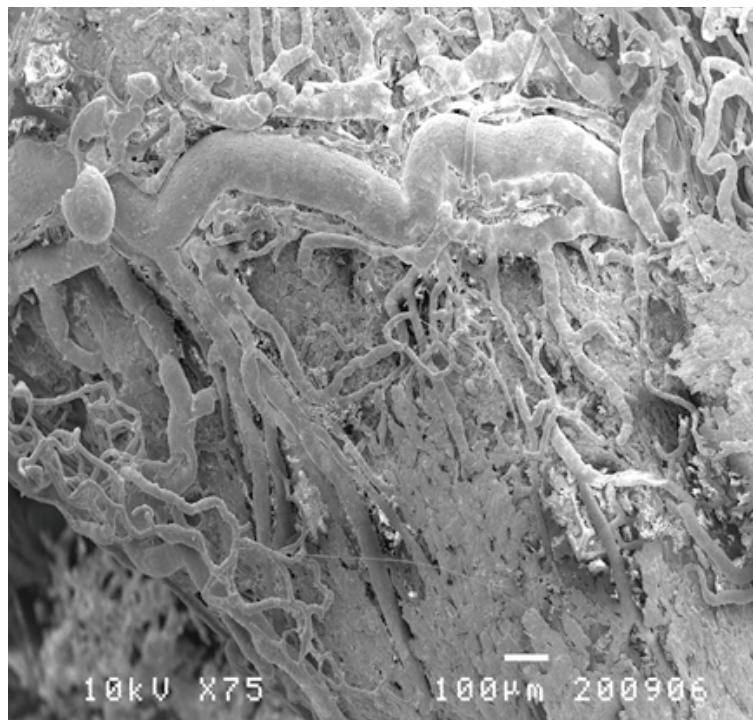
**FIG. 44** Microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares — 750x.  
Arteríolas radiárias internas

### Relações

As arteríolas radiárias internas relacionam-se no seu trajecto com a parede do modíolo. Na porção basal da cóclea relacionam-se com a lâmina espiral secundária e com a lâmina espiral óssea primária, relacionando-se em cada espira com a parede da rampa timpânica, que se apresenta rugosa e perfurada por numerosos orifícios vasculares.

### Trajecto

Após a sua origem inflectem-se para cima, ascendem na parede do modíolo até cerca de dois terços do espaço entre duas espiras consecutivas, aí inflectem-se para fora e para baixo descrevendo ansas vasculares que atingem o bordo externo da lâmina espiral óssea (FIG. 45).



**FIG. 45** Microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares — 75x.

Observação das arteríolas radiárias internas a circundar o bordo livre da lâmina espiral óssea formando verdadeiras arcadas vasculares.

Ao ascender no modíolo ou ainda no seu trajecto na lâmina espiral óssea, formam ansas vasculares, por vezes de calibre constante ao longo do trajecto, e dividem-se sem apresentar constrições vasculares nos pontos de ramificação, originando novas ansas vasculares de calibre inferior à artéria de origem.

### Ramos Colaterais

As arteríolas radiárias internas originam como ramos colaterais, vários grupos de arteríolas de menor calibre, que vascularizam distintas regiões da parede interna da cóclea.

Quatro grupos de arteríolas merecem especial destaque:

1. As arteríolas do gânglio espiral.
2. A rede espiral interna.
3. As arteríolas de origem dos glomérulos de Schwalbe.
4. A Arteriola da lâmina basilar.

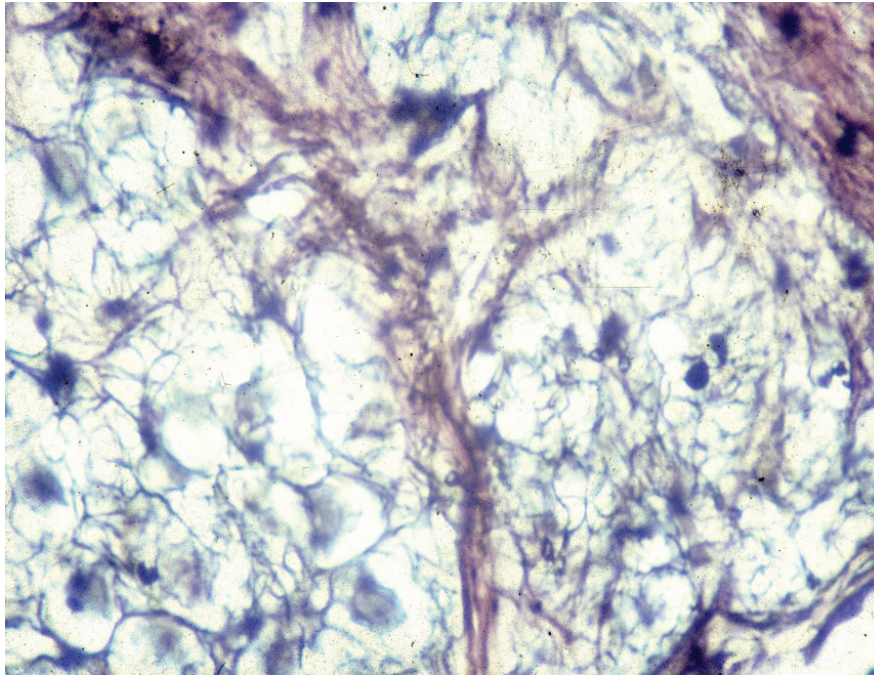


**FIG. 46** Microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares — 200x.  
Disposição das arteríolas na parede do modíolo.

#### *3.3.2.1.1.1. Arteríolas do Gânglio Espiral*

Conjunto de arteríolas pré-capilares de calibre médio de cerca de 12 µm que se ramificam num rico plexo capilar que vasculariza as células ganglionares do gânglio espiral de Corti.





**FIG. 47** Técnica histológica com impregnação pela prata, técnica de Gomori em cóclea perfundida com tinta-da-China — 480x.



**FIG. 48** Microscopia electrónica de varrimento em moldes microvasculares — 350x.  
Artéria modiolar e início da formação da rede espiral interna.  
Origem centrípeta dos capilares para o gânglio espiral.



### 3.3.2.1.1.2. Arteriolas da Rede Espiral Interna

Observa-se a emergência e trajecto flexuoso das arteriolas constituintes da rede espiral interna com calibre entre  $15,7\ \mu\text{m}$  e  $10,7\ \mu\text{m}$  originando capilares de calibre inferior a  $10\ \mu\text{m}$  (FIG. 48).

São arteriolas pré-capilares que se originam como colaterais das arteriolas radiárias.

Estas ao ascender no modíolo entre duas espiras, originam junto ao lábio timpânico da lâmina espiral arteriolas de terceira ordem ou arteriolas pré-capilares que apresentam um trajecto mais flexuoso em relação estreita com o bordo livre da lâmina espiral óssea formando a rede espiral interna.

A rede espiral interna é constituída por arteriolas de 3.º ordem que formam junto ao bordo livre da lâmina espiral óssea, ansas vasculares que com trajecto flexuoso percorrem a parede do modíolo entre duas espiras, formando em termos hemodinâmicos verdadeiras estações intermédias, para através da rede capilar a que dão origem, promoverem a vascularização das estruturas sensorioneurais adjacentes (FIG. 49).



**FIG. 49** Técnica de microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares — 500x.  
 Rede espiral interna na espira basal observando-se arteriolas com calibre entre  $21,2\ \mu\text{m}$  e  $11,4\ \mu\text{m}$ .  
 Medição de calibres vasculares com *SEMAfore*.

### 3.3.2.1.1.3. Glomérulos de Schwalbe

Os glomérulos cocleares de Schwalbe elevam-se até perto da *scala timpani* (FIG. 50).

Podem distinguir-se dois tipos de glomérulos, morfologicamente idênticos mas com localização diferente. Os glomérulos superiores situam-se na parede óssea do modíolo os inferiores localizam-se perto da lâmina espiral óssea na largura da lâmina espiral óssea.

São estes as verdadeiras estações intermédias (Relay stations) em termos hemodinâmicos da microvascularização coclear.

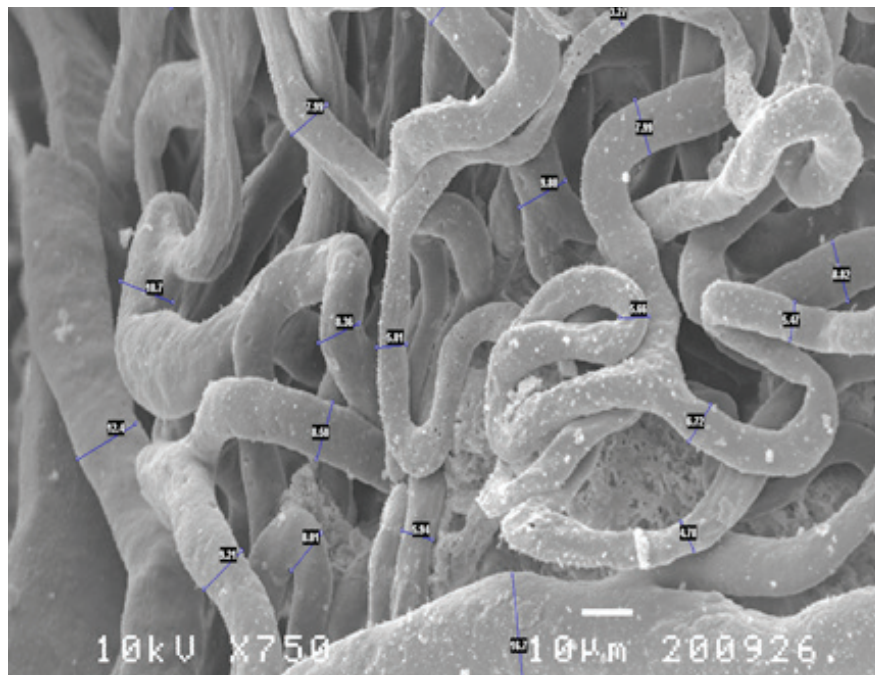


**FIG. 50** Técnica de microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares — 400x.  
Glomérulos cocleares de Schwalbe.

Os glomérulos superiores percorrem um trajecto ascendente, na parede modiolar, aproximando-se da margem da lâmina espiral da espira basal superior.

Os glomérulos inferiores percorrem um trajecto centrífugo ao longo da lâmina espiral óssea.

Os capilares formam, através das suas anastomoses, redes capilares em relação íntima com as estruturas sensorioneurais da lâmina espiral (FIG. 51).



**FIG. 51** Microscopia electrónica de varrimento em moldes microvasculares — 750x.  
Observação do glomérulo de Schwalbe inteiramente constituído por capilares.

No que concerne a distribuição nas diferentes espiras da cóclea, os glomérulos apresentam uma distribuição mais rica e complexa na espira basal e na segunda espira da cóclea, ficando progressivamente mais esparsos e de menor complexidade em direcção ao ápice.

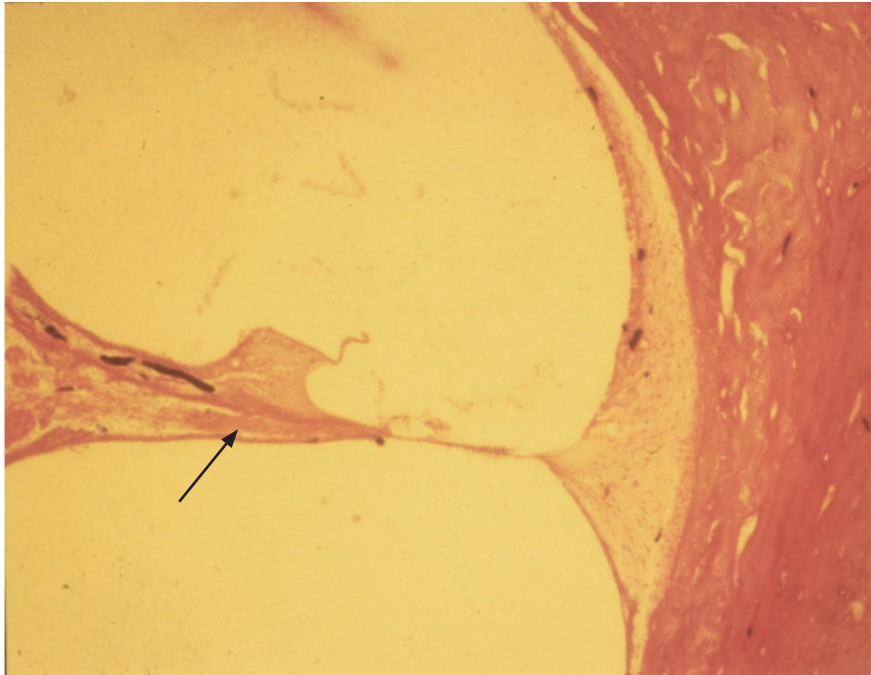
#### 3.3.2.1.1.4. Arteriola da Lâmina Basilar

A arteriola da lâmina basilar origina-se como ramo colateral das arteríolas radiárias internas.

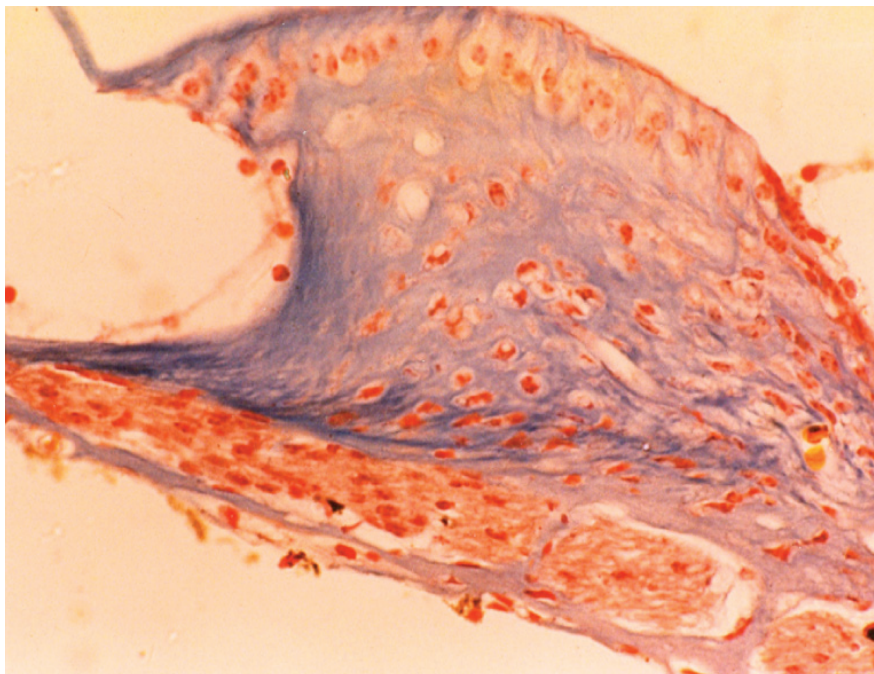
Esta arteriola foi particularmente bem evidenciada através da observação das peças processadas pela técnica histológica.

Tem o seu início junto ao lábio timpânico da lâmina espiral, no labirinto membranoso, percorrendo com trajecto mais ou menos rectilíneo, a zona interna da lâmina basilar (FIG. 52)





**FIG. 52** Técnica histológica — 70x. Coloração de hematoxilina-eosina após perfusão com tinta-da-China. Arteríola da lâmina basilar injectada com tinta-da-China e assinalada com seta.



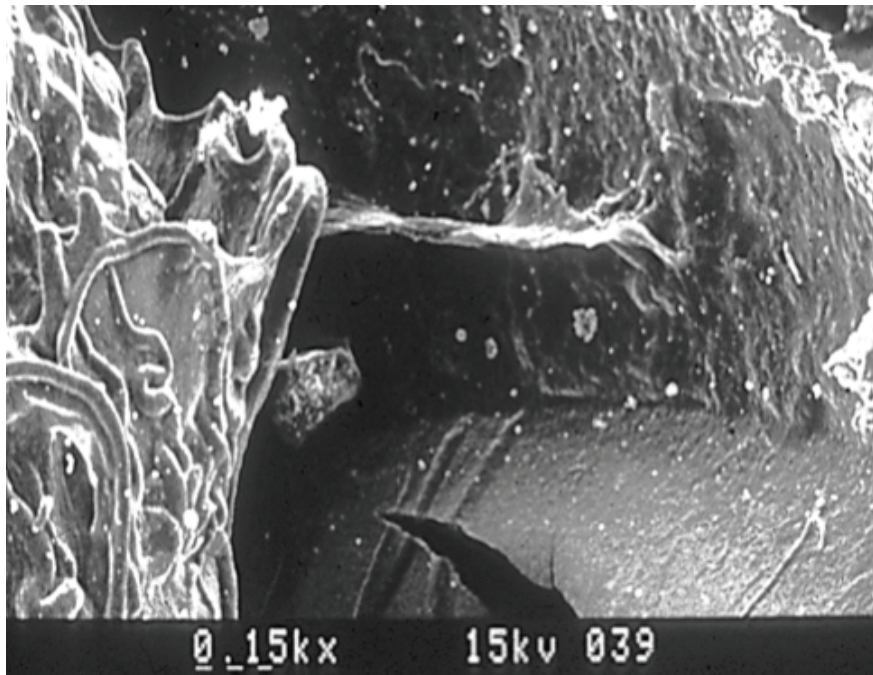
**FIG. 53** Técnica histológica — 300x. Coloração de tricrômico de Masson. Visualização da arteríola modiolar na porção inicial da lâmina basilar.

#### 3.3.2.1.2. Arteriolas Radiárias Externas

As arteriolas radiárias externas importantes ramos colaterais da artéria modiolar espiralada promovem a vascularização de importantes estruturas da parede externa.

##### Origem

As arteriolas radiárias externas têm a sua origem na artéria modiolar e dirigem-se para a parede externa da cóclea.



**FIG 54** Microscopia electrónica de varrimento com corrosão incompleta — 15x.  
Observa-se o trajecto das arteriolas radiárias externas na parede superior da rampa vestibular.

Lançam-se na rampa vestibular e percorrem a parede superior da rampa vestibular de cada uma das espiras (**FIG. 54**).

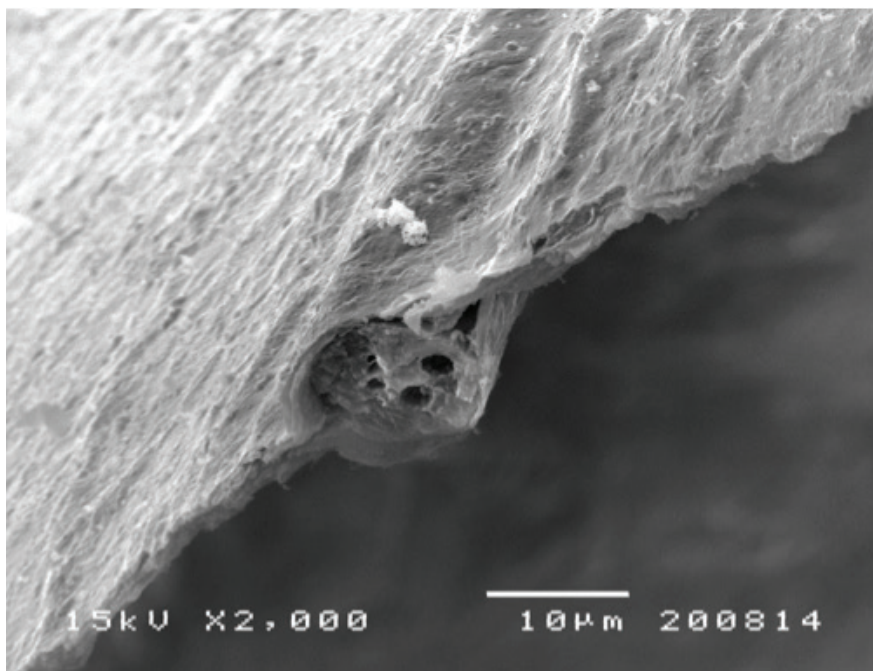
Descem depois um pouco na parede externa da cóclea e penetram no ligamento espiral onde se ramificam, inicialmente numa rede de arteriolas pré-capilares arteriulares que originam depois a rede capilar junto à estria vascular.

### Trajecto

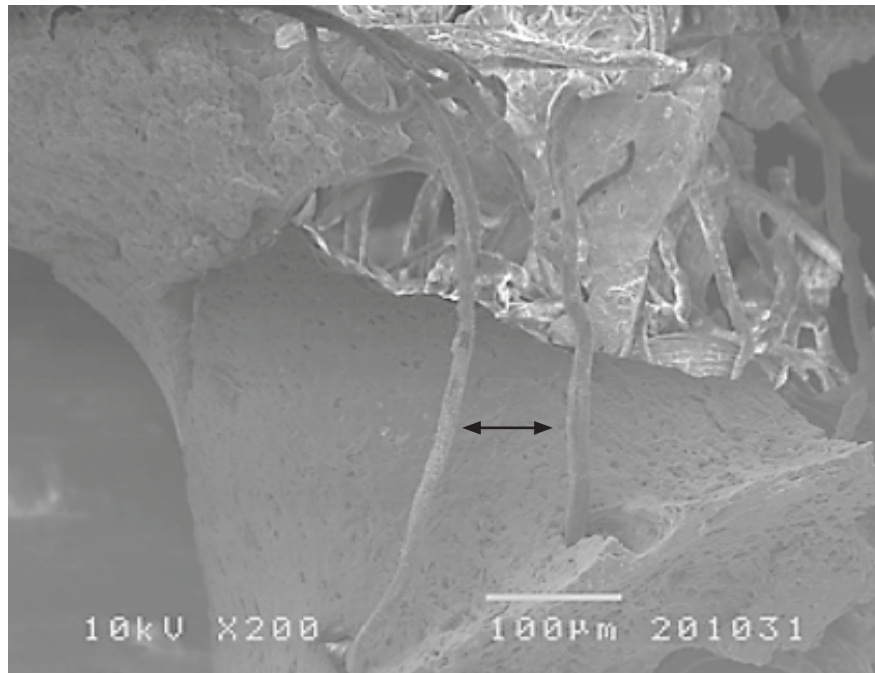
Após a origem, as arteríolas radiárias externas inflectem-se para cima, descrevendo uma curvatura de convexidade superior que acompanha a parede superior da própria rampa vestibular, condicionando nesta um relevo (FIG. 55), percorrendo-a e dirigindo-se até às estruturas da parede externa da cóclea membranosa.

### Calibre

As arteríolas radiárias externas têm menor calibre do que as arteríolas radiárias internas. Os valores do calibre variam entre 12 e 14  $\mu\text{m}$ , sendo este relativamente homogéneo ao longo do seu trajecto na parede superior da rampa vestibular, já que a este nível não originam ramos colaterais.



**FIG. 55** Microscopia electrónica de varrimento com corrosão incompleta — 2000x.  
Corrosão incompleta da parede superior da rampa vestibular, observando-se o trajecto de uma arteríola radiária externa.



**FIG. 56** Microscopia electrónica de varrimento com corrosão incompleta — 200x.  
Corrosão da parede superior da rampa vestibular, observando-se o trajecto paralelo de duas arteríolas radiárias externas (seta).

### Relações

Relacionam-se na porção inicial com o lábio vestibular da lâmina espiral, depois com a parede superior da rampa vestibular, com a porção superior da cóclea membranosa também na face superior da rampa vestibular, com a proeminência vestibular e com o ligamento espiral.

### Ramos Colaterais e Terminais

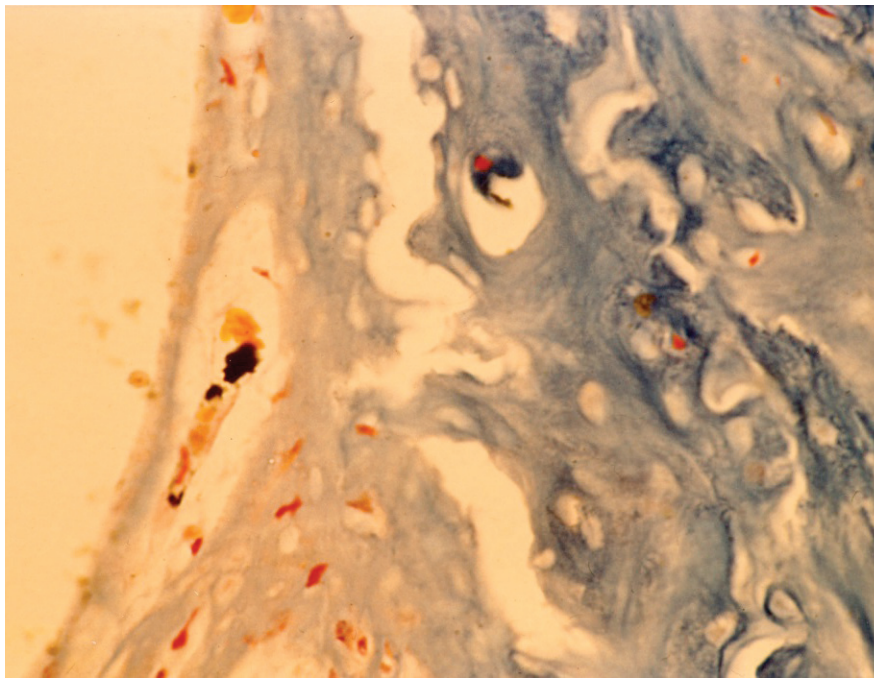
Estes originam-se apenas na porção terminal da rampa vestibular, acima da inserção da lâmina vestibular ou de Reissner. Na parede externa, as arteríolas radiárias externas emitem diferentes tipos de arteríolas:

1. Arteríolas supra-estriadas
2. As arteríolas do ligamento espiral.



#### 3.3.2.1.2.1. Rede Vascular Supra-Estriada

Imediatamente acima da inserção da lâmina vestibular ou de Reissner na parede externa, as arteríolas radiárias externas originam arteríolas pré-capilares as quais originam uma rede capilar que constitui a rede capilar supra-estriada.



**FIG. 57** Técnica histológica — 300x. Tricrômico de Mallory.  
Arteríolas pré-capilares e capilares acima da inserção da lâmina vestibular ou de Reissner, junto à parede externa óssea.

A zona supra-estriada é rica em fibrócitos do tipo V que se dispõem junto às arteríolas do ligamento espiral.

As arteríolas pré-capilares originam a este nível capilares ricos em pericitos, observáveis neste estudo pela técnica de microscopia electrónica de varrimento.

A microdissecção da parede externa da cóclea permitiu observar a microvascularização de toda esta região.

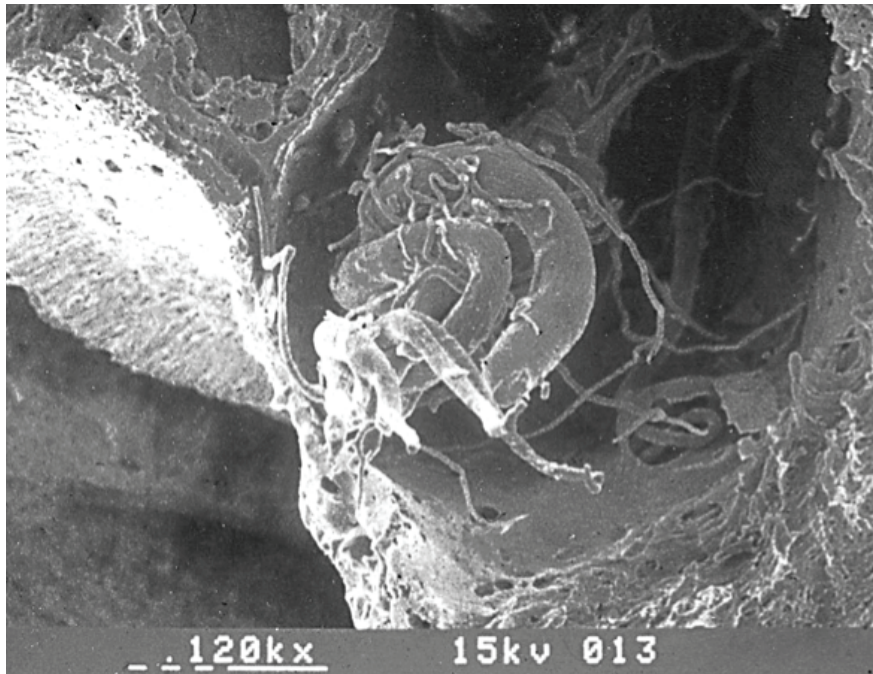
#### 3.3.2.1.2.1. Arteríolas do Ligamento Espiral

Estas arteríolas serão descritas na vascularização da parede externa da cóclea.

### 3.3.2.2. Artéria Modiolar Espiralada e os seus ramos terminais

#### 3.3.2.2.1. Arteriolas do Ápice da Cóclea

A artéria modiolar espiralada ao atingir o ápice coclear divide-se em três a cinco ramos terminais, os quais ascendem no modíolo, após o que na sua porção terminal se inflectem para baixo, seguindo e abraçando a convexidade do ápice da cóclea, com uma disposição que assemelha as varetas de um chapéu-de-chuva (FIG. 58).



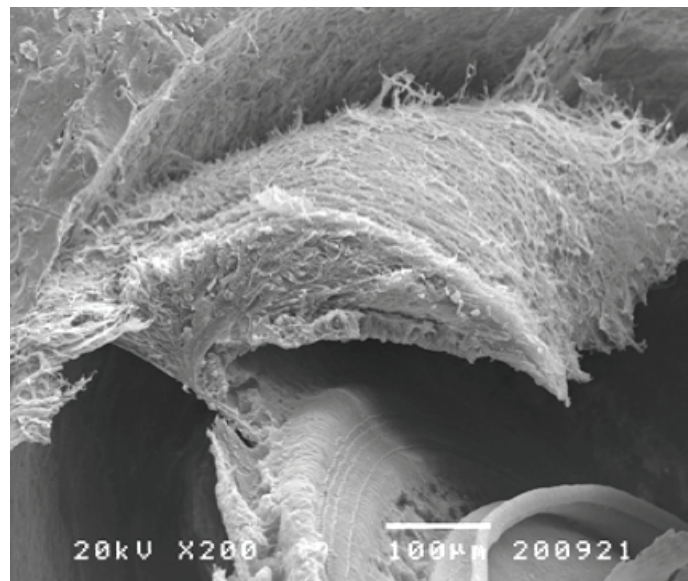
**FIG. 58** Técnica de microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares — 120x.  
Ramos terminais da artéria modiolar espiralada no ápice coclear.

### 3.3.3. Vascularização Arterial da parede externa da Cóclea Membranosa

#### 3.3.3.1. Arteriolas do Ligamento Espiral

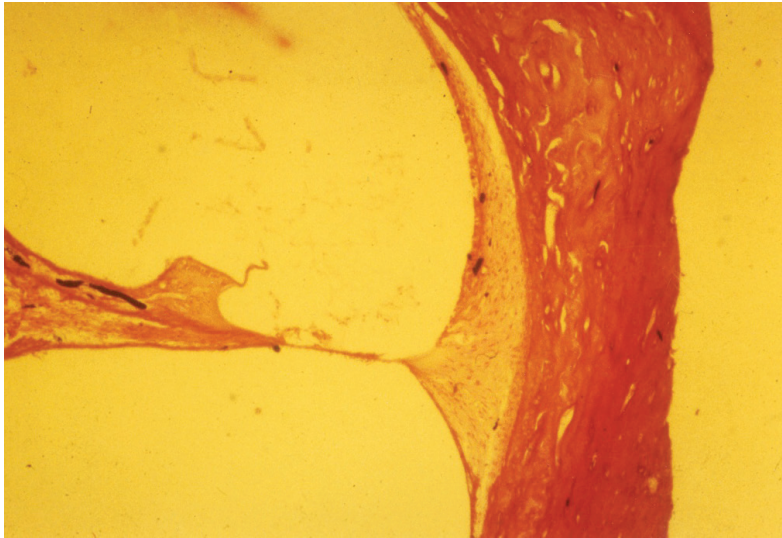
Ao atingir o limite externo do ligamento espiral, as arteríolas radiárias externas dividem-se em vários ramos arteriulares de menor calibre, ao longo da convexidade do limite externo do ligamento espiral. O ligamento espiral forma uma malha de tecido conjuntivo com função de sustentação do epitélio altamente especializado que constitui a estria vascular (FIG. 59).

Foi possível observar pericitos em todo o ligamento espiral.



**FIG. 59** Microscopia electrónica de varrimento com corrosão incompleta — 200x.  
Pormenor do ligamento espiral e da estria vascular.

Considerando a riqueza e distribuição dos fibrócitos e dos pericitos no ligamento espiral, esta correlaciona-se de algum modo com o padrão de microvascularização a este nível.



**FIG. 60** Técnica histológica coloração de hematoxilina-eosina pós injeção vascular com tinta-da-China — 60x. Vascularização arterial do ligamento espiral e estria vascular.

A vascularização arterial do ligamento espiral é promovida por arteríolas pré-capilares que percorrem o ligamento espiral da sua porção lateral para a porção medial e que se dividem em duas redes distintas (**FIG. 60**):

A rede capilar *pós-estriada* que ocupa a porção lateral do ligamento espiral e ocupa a sua base, junto à parede externa da cóclea.

A rede capilar *ad-estriada*, na sua porção mais medial em íntima relação com a estria vascular.

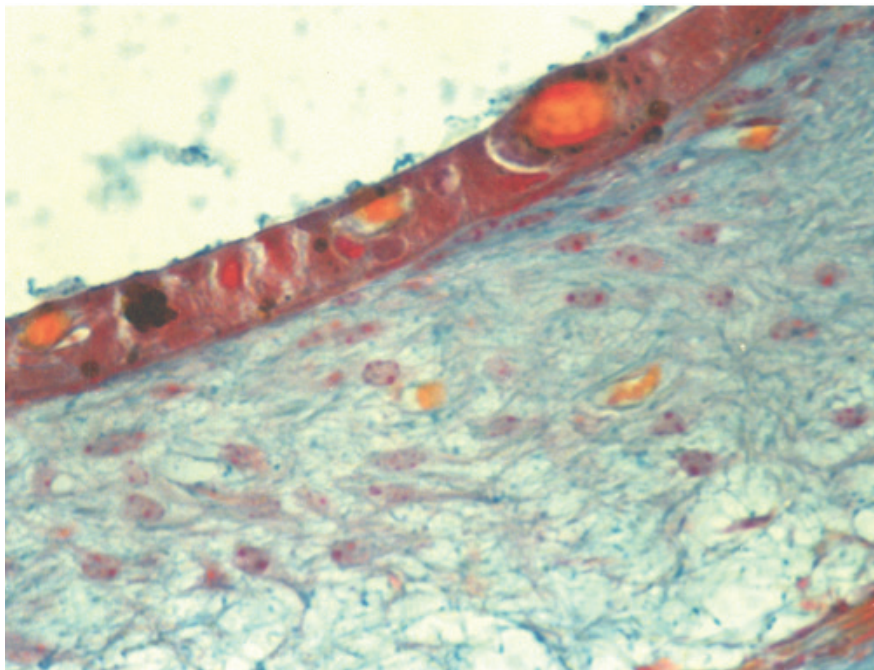


**FIG. 61** Microscopia electrónica de varrimento em moldes microvasculares com morfometria vascular sistema *SEMAfore* — 350x. Morfometria da vascularização do ligamento espiral e da estria vascular na rampa média da 2.ª espira.



### 3.3.3.2. Rede capilar da Estria Vascular

A estria vascular é o único epitélio vascularizado do corpo humano. Sabe-se que a estria vascular tem grande importância funcional na produção e reabsorção de endolinfa (FIG. 62).

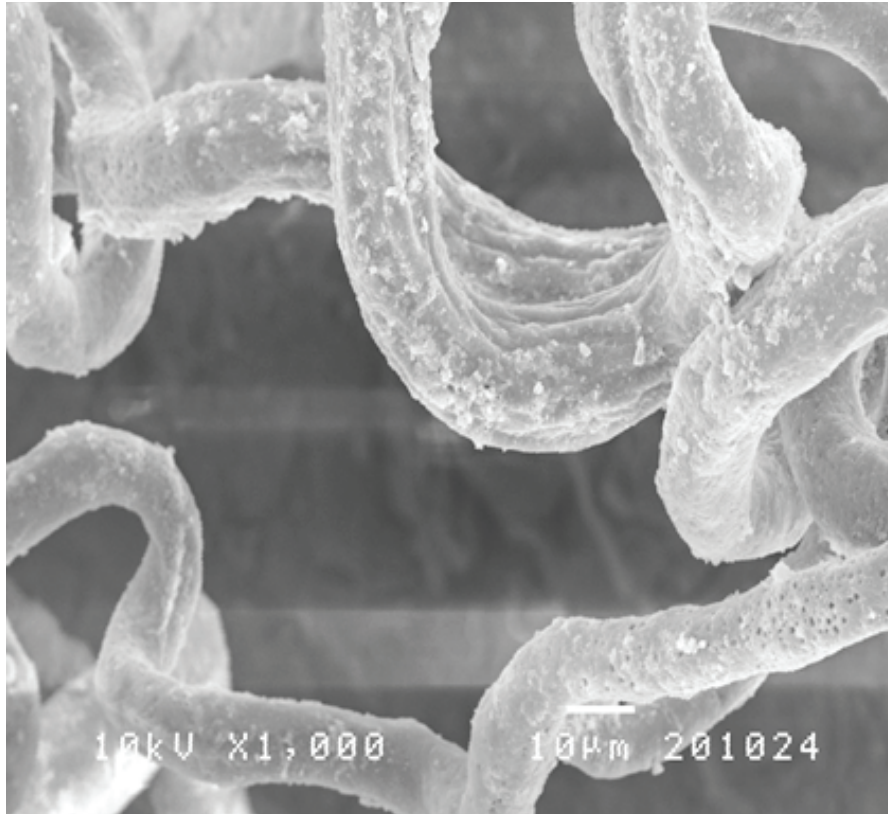


**FIG. 62** Técnica histologia — 150x. Tricrômico de Masson.  
Pormenor do ligamento espiral e da estria vascular observando-se nesta os capilares ainda preenchidos por hemácias e células com pigmento melanócito mais evidenciadas.

A estria vascular desempenha uma importante função, formando uma barreira hemato-labiríntica para manutenção do potencial endococlear e transporte de iões, fundamental para o mecanismo de transdução das células ciliadas.

O estudo da microvascularização da estria vascular foi feito por observação das várias peças, utilizando todas as técnicas de estudo, embora com a técnica histológica se tenha revelado mais fácil evidenciar a relação com o ligamento espiral.

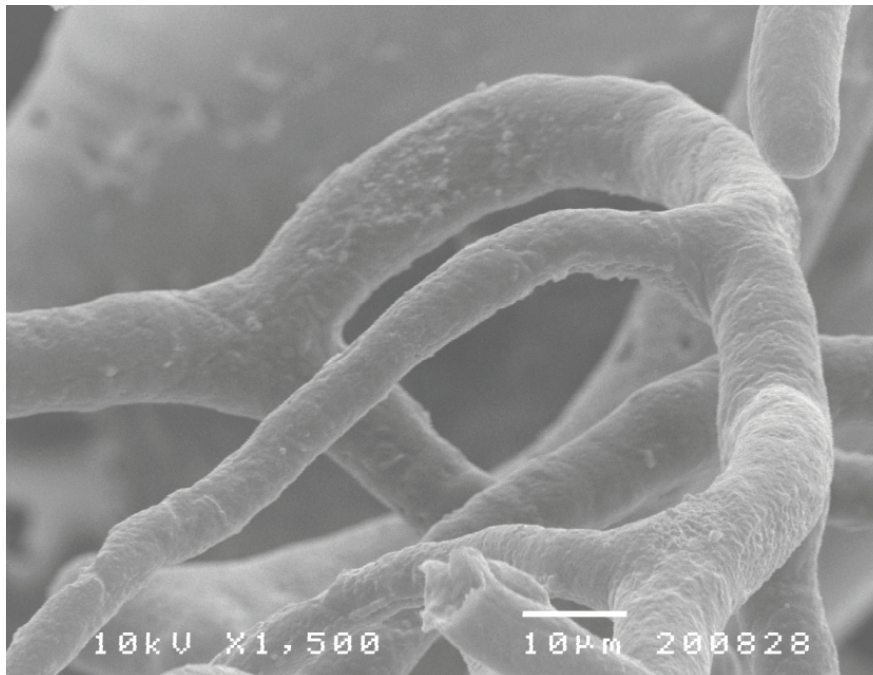
A morfometria arterial foi feita nas peças trabalhadas com microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares (FIG. 63) recorrendo ao sistema *SEMAfore*.



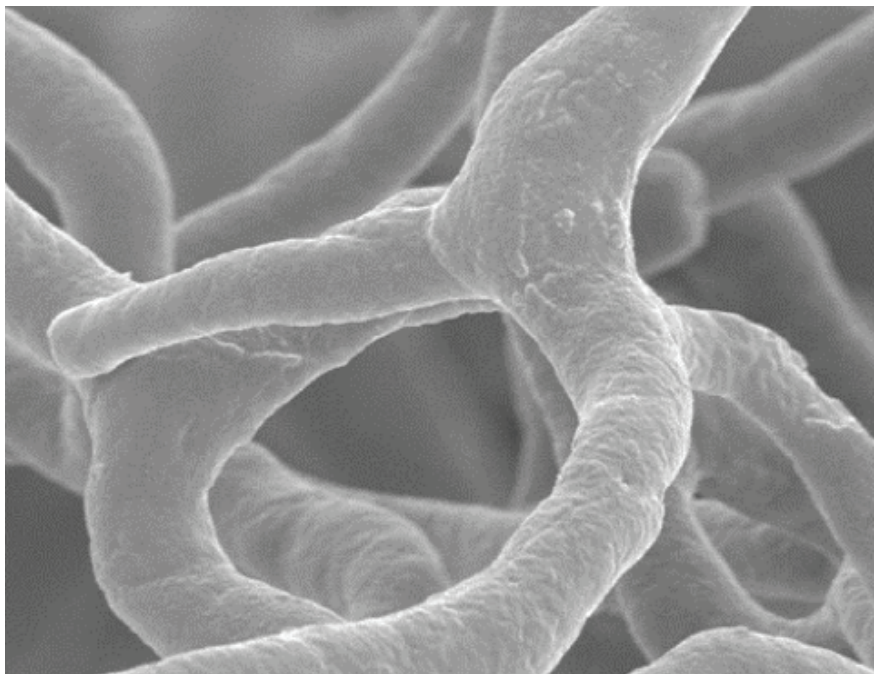
**FIG. 63** Microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares — 1000x.  
Origem da rede capilar da estria vascular em arteríolas pré-capilares.

Em termos microvasculares a estria vascular apresenta um sistema vascular inteiramente formado por capilares, formando um conjunto de anastomoses inter-capilares complexas (FIG. 64 e 65).





**FIG. 64** Microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares — 1500x.  
Anastomoses complexas entre os capilares da estria vascular.



**FIG. 65** Microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares — 1700x.  
Das anastomoses complexas entre os capilares da estria vascular parecem originar-se novos capilares.

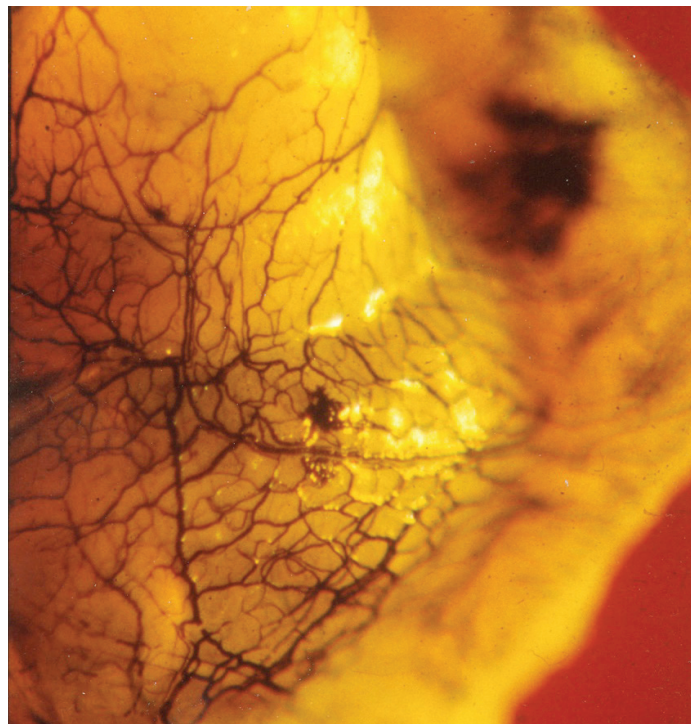
### 3.3.4. Vascularização da parede externa da Espira Basal

A espira basal da cóclea apresenta grande riqueza de vascularização (FIG. 66), com características particulares apenas a esta espira.

Na parede exterior apresenta a região das janelas, a janelas redonda que dá acesso à rampa timpânica da cóclea e a janelas oval que se relaciona com o vestíbulo e a platina do estribo.

Em termos anatomo-fisiológicos, esta espira é, metabolicamente, a mais exigente.

É nesta espira que se realiza a transdução dos sons agudos. Pelo seu papel na tonotopia coclear as estruturas da parede interna da cóclea, as células ciliadas e as estruturas da parede externa, o ligamento espiral e a estria vascular são nesta região particularmente vulneráveis à hipóxia.

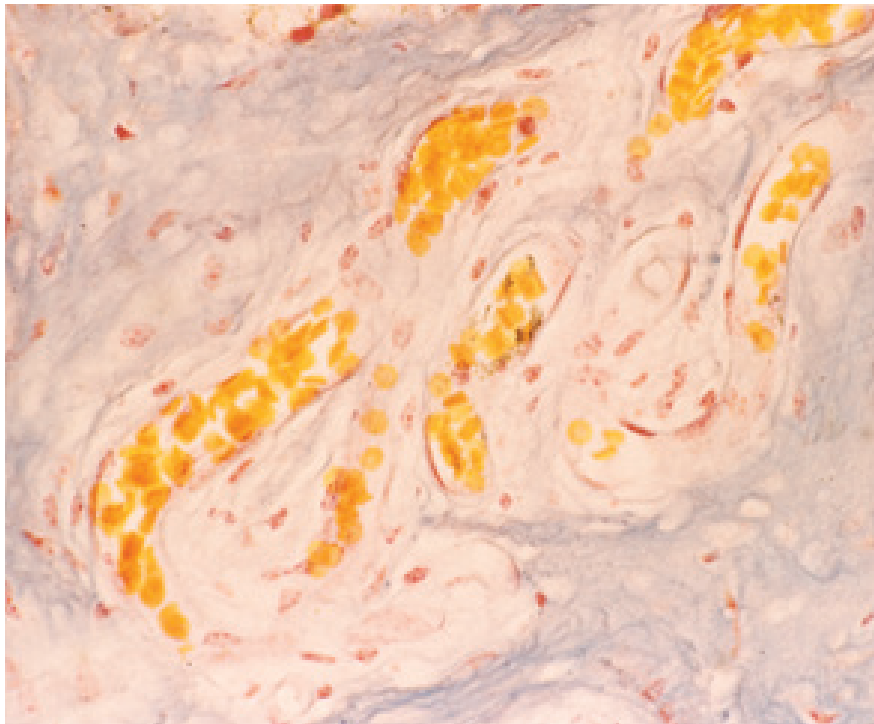


**FIG. 66** Técnica de diafanização pós injeção com tinta-da-China — 10x.  
Observa-se a parede externa da cóclea óssea com grande destaque para a vascularização da espira basal.

Ao nível da base da cóclea, após emissão da artéria vestibular, a artéria labiríntica divide-se na artéria vestibulo-coclear ou vestibular posterior, no cobaio, e a artéria modiolar que penetra a base do modíolo.

A artéria vestibular posterior caminha na parede óssea da espira basal e forma uma convexidade longitudinal que se distribui à espira basal e à porção inferior da segunda espira

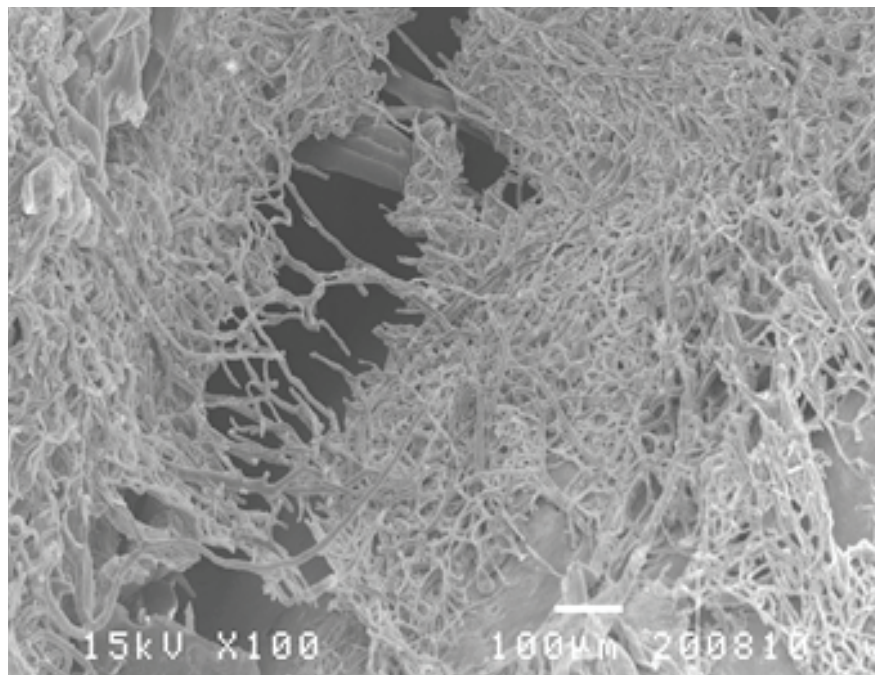
Neste trajecto na parede óssea origina ramos colaterais que se distribuem a toda a extensão da parede externa da cóclea. Alguns destes penetram a parede óssea da cóclea, e dirigem-se para a cóclea membranosa originando ramos por vezes perpendiculares à direcção da própria artéria (FIG. 67).



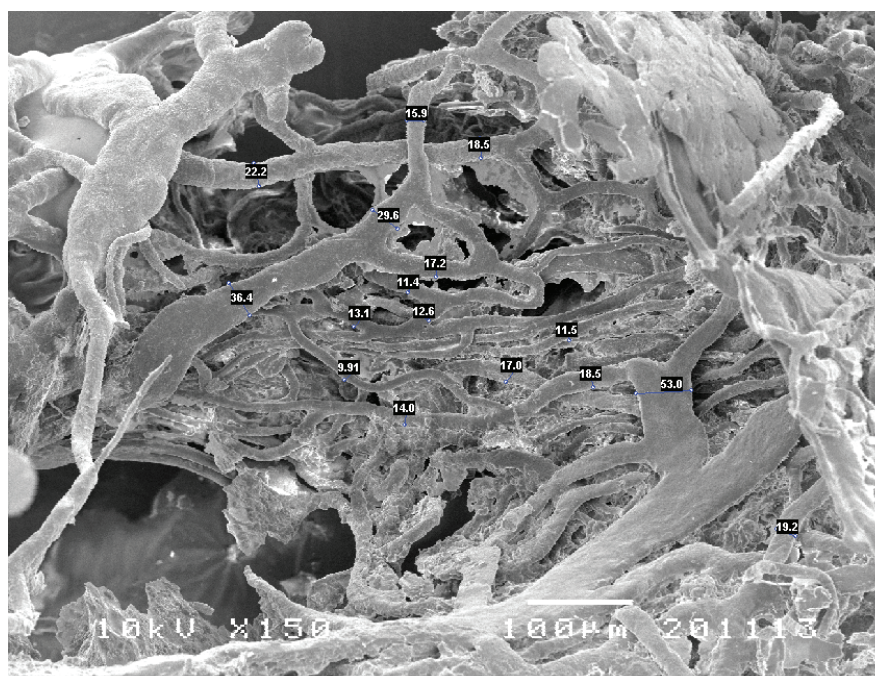
**FIG. 67** Técnica histológica — 50x. Tricrómico de Masson.  
Trajecto vascular na parede externa da cóclea.

As artérias radiárias externas atingem maior número na espira basal. Ao nível da rampa média ou coclear desta espira, penetram o ligamento espiral originando três redes capilares distintas e já descritas, a rede supra-estriada, a rede do ligamento espiral e a rede da estria vascular (FIG. 68 e 69).



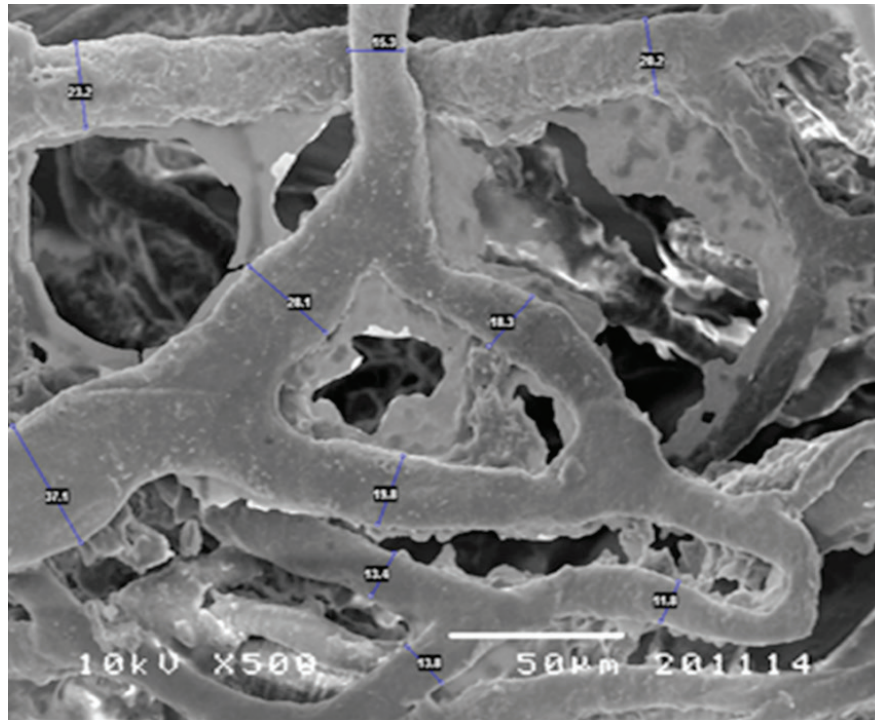


**FIG. 68** Microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares — 100x.  
Vascularização da parede externa das duas primeiras espiras da cóclea, observando-se a grande e profusa rede vascular amplamente anastomosada.



**FIG. 69** Microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares — 150x.  
Observa-se a vascularização da porção interior da parede externa da espira basal da cóclea  
Medição dos calibres vasculares com sistema *SEMAfore*.

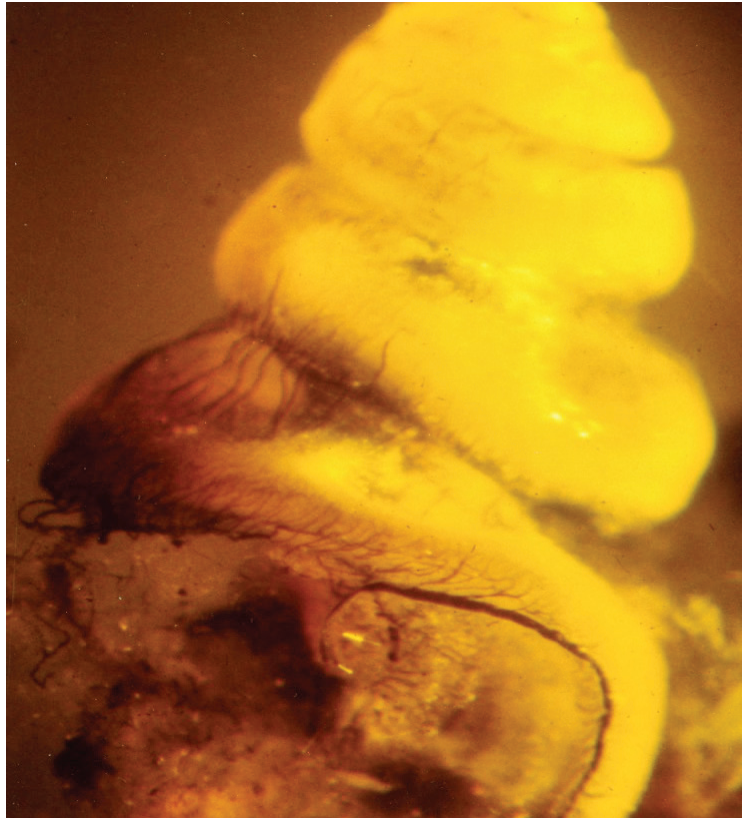
Observa-se nesta parede a existência de um amplo sistema de anastomoses particularmente evidente na região correspondente à parede externa da rampa média ou coclear. As anastomoses observáveis na estria vascular têm grande complexidade e estabelecem-se entre vasos de diferentes calibres (FIG. 70).



**FIG. 70** Microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares — 500x.  
Pormenor da figura anterior, anastomose arteriovenosa complexa com morfometria vascular.

#### 3.3.4.1 Arteriola da Janela Redonda

Na espira basal da cóclea procedeu-se ao estudo da microvascularização da janela redonda, estrutura de grande importância anátomo-funcional por dar acesso directo à rampa timpânica da cóclea (FIG. 71).

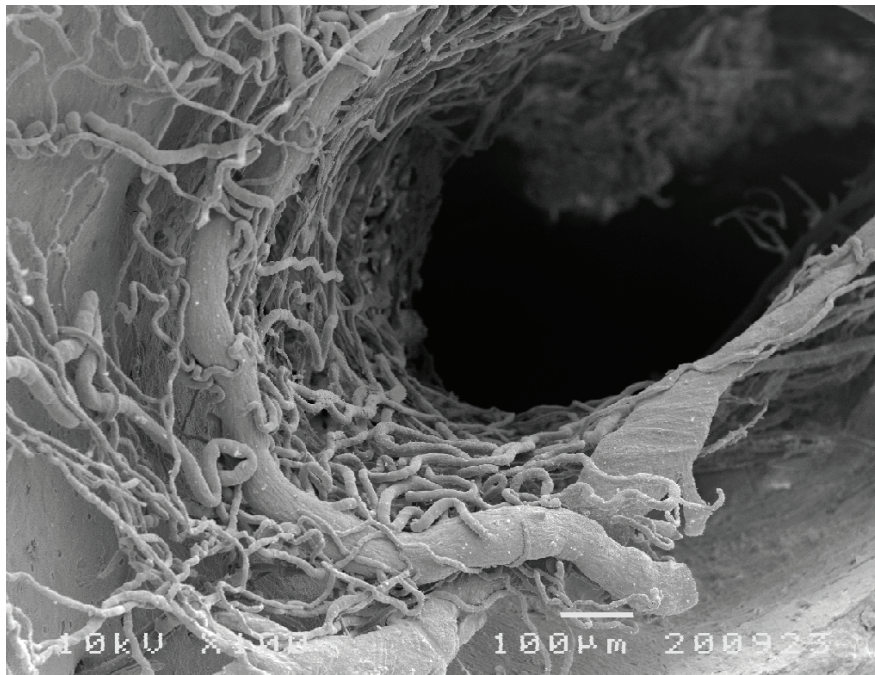


**FIG. 71** Técnica de diafanização pós-injecção vascular de tinta-da-China — 15x.  
Morfologia da cóclea membranosa, com observação da arteríola da janela redonda ou janela da cóclea.

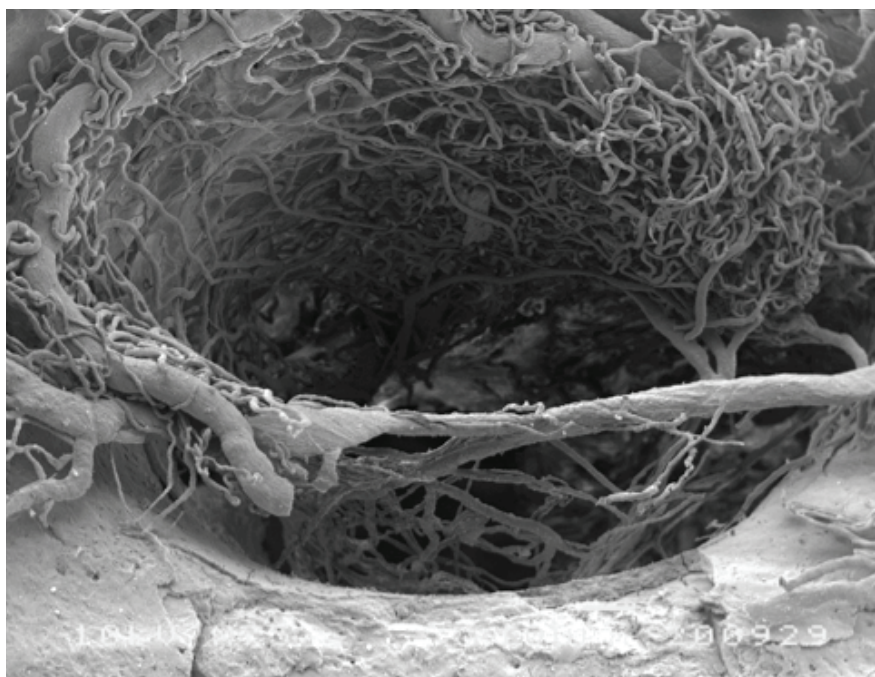
A arteríola da janela da cóclea aborda a janela da cóclea pela sua convexidade e divide-se numa rica rede vascular que vasculariza toda a parede externa da rampa timpânica da cóclea (**FIG. 72 e 73**).

Da arteríola da janela da cóclea em todo o seu trajecto de contorno ao longo da própria janela emergem arteríolas pré-capilares que se ramificam em capilares os quais se dirigem em profundidade penetrando a rampa timpânica da cóclea ao nível da espira basal.





**FIG. 72** Microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares — 100x.  
Observação tridimensional da vascularização da janela redonda e início da rampa timpânica.



**FIG. 73** Microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares — 75x.  
Observação tridimensional da vascularização da janela redonda e início da rampa timpânica.

4.

ESTUDO MORFOMÉTRICO DA  
MICROVASCULARIZAÇÃO ARTERIAL  
DA CÓCLEA

## **4.1 DADOS UTILIZADOS**

Apresentam-se os resultados do estudo morfométrico e tratamento estatístico dos valores de calibre das arteríolas e capilares da parede interna da cóclea e da parede externa da cóclea.

A dificuldade de estudo da cóclea é condicionada pela sua fragilidade e pela dificuldade de manipulação das estruturas vasculares.

A exigência na morfometria dos calibres dos vasos traduziu-se em diferente número de valores usados, considerando cada uma das estruturas. Este facto traduz-se na ponderação do coeficiente de variância consoante o número de valores para cada estrutura. Esta ponderação para cada estrutura permitiu validar o estudo estatístico, como adiante se constata.

## **4.2. GLOSSÁRIO**

Cada estrutura tem o seguinte código numérico.

1. Capilares da estria vascular e do ligamento espiral.
2. Arteríolas radiárias internas na sua emergência.
3. Arteríolas pré-capilares da rede espiral interna.
4. Capilares da rede espiral interna.
5. Arteríolas da parede externa da espira basal  $<10\ \mu\text{m}$ .
6. Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe  $<10\ \mu\text{m}$ .

A dificuldade técnica no tratamento das peças levou a que em alguns casos o valor de calibre traduziu-se apenas num caso ou na média de dois, três, quatro ou até cinco casos, tendo este parâmetro sido devidamente valorizado em termos de variância.

Esta questão está contemplada nos quadros que se seguem.

### 4.3. PAREDE INTERNA DA CÓCLEA

#### 4.3.1. Morfometria das Arteríolas Radiárias Internas

Tipo de estrutura vascular	Código da Estrutura	N.º Casos	Calibre (µm)
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	1	25.8
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	1	24.2
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	1	28.8
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	1	25
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	1	29.9
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	1	33
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	1	21.4
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	1	23.6
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	1	20.1
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	1	29.4
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	1	33
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	1	41
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	1	30.1
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	1	32.4
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	1	25
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	1	28.7
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	1	39.3
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	1	32.4
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	2	26.2
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	2	29.9
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	2	26.5
Arteríolas, radiárias internas na sua emergência	2	2	29.7

*cont.*

*cont.*

Tipo de estrutura vascular	Código da Estrutura	N.º Casos	Calibre (µm)
Arteriolas, radiárias internas na sua emergência	2	2	33.9
Arteriolas, radiárias internas na sua emergência	2	2	32.5
Arteriolas, radiárias internas na sua emergência	2	2	20.4
Arteriolas, radiárias internas na sua emergência	2	2	21.4

#### 4.3.1.1. Morfometria das arteriolas da Rede Espiral Interna

Tipo de estrutura vascular	Código da Estrutura	N.º Casos	Calibre (µm)
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	1	10.3
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	1	18.8
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	1	16.1
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	1	18.2
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	1	19.4
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	1	11.1
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	2	12.36
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	2	11.25
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	2	10.67
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	2	18.38
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	2	12.65
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	3	12.98
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	3	14.78
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	3	17.85
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	3	16.65
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	3	11.25
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	3	12.98
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	3	11.98
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	4	14.56
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	4	11.36
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	4	10.53

*cont.*



*cont.*

Tipo de estrutura vascular	Código da Estrutura	N.º Casos	Calibre (µm)
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	4	12.65
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	4	13.65
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	4	12.65
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	4	12.45
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	5	12.56
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	5	13.65
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	5	12.65
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	5	13.89
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	5	13.98
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	5	14.54
Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	3	5	16.67

#### 4.3.1.2. Morfometria dos capilares da Rede Espiral Interna

Tipo de estrutura vascular	Código da Estrutura	N.º Casos	Calibre (µm)
Capilares da rede espiral interna	4	1	8.62
Capilares da rede espiral interna	4	1	6.67
Capilares da rede espiral interna	4	1	
Capilares da rede espiral interna	4	1	5.25
Capilares da rede espiral interna	4	1	9.63
Capilares da rede espiral interna	4	1	7.65
Capilares da rede espiral interna	4	1	8.11
Capilares da rede espiral interna	4	1	7.65
Capilares da rede espiral interna	4	2	8.25
Capilares da rede espiral interna	4	2	7.35
Capilares da rede espiral interna	4	2	-
Capilares da rede espiral interna	4	2	9.25
Capilares da rede espiral interna	4	2	8.78
Capilares da rede espiral interna	4	2	7.98

*cont.*

*cont.*

Tipo de estrutura vascular	Código da Estrutura	N.º Casos	Calibre (µm)
Capilares da rede espiral interna	4	2	8.32
Capilares da rede espiral interna	4	2	8.65
Capilares da rede espiral interna	4	3	7.98
Capilares da rede espiral interna	4	3	8.25
Capilares da rede espiral interna	4	3	8.35
Capilares da rede espiral interna	4	3	6.98
Capilares da rede espiral interna	4	3	7.25
Capilares da rede espiral interna	4	3	6.96
Capilares da rede espiral interna	4	3	7.88
Capilares da rede espiral interna	4	3	9.45
Capilares da rede espiral interna	4	4	8.25
Capilares da rede espiral interna	4	4	8.35
Capilares da rede espiral interna	4	4	8.25
Capilares da rede espiral interna	4	4	8.45
Capilares da rede espiral interna	4	4	8.25
Capilares da rede espiral interna	4	4	7.88
Capilares da rede espiral interna	4	4	7.85
Capilares da rede espiral interna	4	4	8.54
Capilares da rede espiral interna	4	5	8.65
Capilares da rede espiral interna	4	5	7.56
Capilares da rede espiral interna	4	5	8.36
Capilares da rede espiral interna	4	5	6.25
Capilares da rede espiral interna	4	5	5.98
Capilares da rede espiral interna	4	5	9.87
Capilares da rede espiral interna	4	5	9.25
Capilares da rede espiral interna	4	5	8.98

## 4.3.1.3. Morfometria dos Capilares da rede Glomerular de Schwalbe

Tipo de estrutura vascular	Código da Estrutura	N.º Casos	Calibre (µm)
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	4.78
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	5.94
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	8.36
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	8.5
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	4.78
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	6.77
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	5.66
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	4.3
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	5.65
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	7.9
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	5.8
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	6.3
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	4.9
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	6.23
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	6.01
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	5.03
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	4.07
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	4.24
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	4.21
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	5.32
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	5.67
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	4.29
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	5.8
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	5.27
Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm	6	1	5.37

#### 4.4. PAREDE EXTERNA DA CÓCLEA

##### 4.4.1. Morfometria das arteríolas da parede externa da Espira Basal

Tipo de estrutura vascular	Código da Estrutura	N.º Casos	Calibre (µm)
Arteríolas da parede externa da espira basal >10 µm	5	1	11.5
Arteríolas da parede externa da espira basal >10 µm	5	1	13.1
Arteríolas da parede externa da espira basal >10 µm	5	1	17
Arteríolas da parede externa da espira basal >10 µm	5	1	18.5
Arteríolas da parede externa da espira basal >10 µm	5	1	14
Arteríolas da parede externa da espira basal >10 µm	5	1	12.6
Arteríolas da parede externa da espira basal >10 µm	5	1	18.5
Arteríolas da parede externa da espira basal >10 µm	5	1	15.9

##### 4.4.2. Morfometria dos capilares do Ligamento Espiral e Estria Vascular

Estrutura vascular	código	coluna	Calibre (µm)
Capilares da estria vascular e ligamento espiral <10 µm	1	2	9.05
Capilares da estria vascular e ligamento espiral <10 µm	1	2	6.77
Capilares da estria vascular e ligamento espiral <10 µm	1	2	8.18
Capilares da estria vascular e ligamento espiral <10 µm	1	2	6.23
Capilares da estria vascular e ligamento espiral <10 µm	1	2	9.28
Capilares da estria vascular e ligamento espiral <10 µm	1	2	8.47
Capilares da estria vascular e ligamento espiral <10 µm	1	2	9.49
Capilares da estria vascular e ligamento espiral <10 µm	1	2	8.3
Capilares da estria vascular e ligamento espiral <10 µm	1	2	6.13
Capilares da estria vascular e ligamento espiral <10 µm	1	2	9.05

#### 4.5. ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS

ID	ESTRUTURA	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VARIÂNCIA	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
1	Capilares da estria vascular e do ligamento espiral	10	8.1	1.3	1.6	16
2	Arteriolas, radiárias internas na sua emergência	26	28.6	5.4	28.7	19
3	Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna	35	13.4	3.0	8.7	22
4	Capilares da rede espiral interna	38	8.1	1.0	1.0	12
5	Arteriolas da parede externa da espira basal <10 µm	8	15.1	2.7	7.4	18
6	Capilares constituintes dos glomérulos de schwalbe <10 µm	25	5.6	1.2	1.5	22

#### 4.6. TESTES PARAMÉTRICOS

##### 1. Os calibres das seis estruturas são iguais?

Foi utilizado o teste paramétrico One-Way ANOVA que pressupõe que todos os grupos comparados têm variâncias homogêneas, pelo que primeiro fazemos um teste para verificar este pressuposto (Levene).

##### 1.a Teste de Homogeneidade de Variâncias

**Hipótese:** A variância de calibre de cada uma das seis estruturas é idêntica.

**Teste:** Teste Levene para a Homogeneidade de Variâncias.



TEST OF HOMOGENEITY OF VARIANCES			
calibre			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
15.676	5	136	.000

**Resultado:** O teste Levene indica que as seis estruturas têm variâncias estatisticamente diferentes, violando o pressuposto da realização do teste One-Way ANOVA.

**Consequências:** Apesar deste resultado, vamos realizar o teste One-Way ANOVA porque este é conhecido como sendo bastante robusto à violação do pressuposto de homogeneidade de variâncias. Contudo, poderá verificar-se a redução do poder da One-Way ANOVA para detectar diferenças de calibre entre grupos.

#### 1.b One-Way ANOVA

**Hipótese:** O calibre das seis estruturas são idênticos.

**Teste:** One-Way ANOVA

	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F	SIG.
Between Groups	8890.301	5	1778.060	209.858	.000
Within Groups	1152.285	136	8.473		
Total	10042.586	141			

**Resultado:** Existem diferenças de calibre estatisticamente muito significativas ( $p < 0.01$ ) entre as seis estruturas.

## 2. O calibre entre cada par de estruturas é igual?

**Hipótese:** Para cada par de estruturas comparadas os calibres são iguais.

**Teste:** Comparações Múltiplas de Tamhane (paramétrico)

(I) ESTRUTURA2	(J) ESTRUTURA2	DIFERENÇA MÉDIA (I-J)	DESVIO PADRÃO	SIG.	95% INTERVALO DE CONFIANÇA	
					LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
1	2	-20.5050000	1.1249396	.000	-24.072177	16.937823
	3	-5.2855714	.6402614	.000	-7.293583	3.277559
	4	.0428947	.4311235	.000	-1.525408	1.611197
	5	7.0425000	1.0417672	.001	-11.085911	-2.999089
	6	2.4490000	.4694302	.001	0.839100	4.058900
2	1	20.5050000	1.1249396	.000	16.937823	24.072177
	3	15.2194286	1.1636611	.000	11.572832	18.866025
	4	20.5478947	1.0630333	.000	17.124979	23.970810
	5	13.4625000	1.4245881	.000	8.836515	18.088485
	6	22.9540000	1.0791372	.000	19.498296	26.409704
3	1	5.2855714	.6402614	.000	3.277559	7.293583
	2	-15.2194286	1.1636611	.000	-18.866025	-11.572832
	4	5.3284662	.5239136	.000	3.699607	6.957325
	5	-1.7569286	1.0834652	.882	-5.770649	2.256792
	6	7.7345714	.5558621	.000	6.022689	9.446454
4	1	-.0428947	.4311235	1.000	-1.611197	1.525408
	2	-20.5478947	1.0630333	.000	-23.970810	-17.124979
	3	-5.3284662	0.5239136	.000	6.957325	-3.699607
	5	-7.0853947	0.9745920	.002	11.214742	-2.956048
	6	2.4061053	0.2914026	.000	1.503541	3.308670
5	1	7.0425000	1.0417672	.001	2.999089	11.085911
	2	-13.4625000	1.4245881	.000	-18.088485	-8.836515
	3	1.7569286	1.0834652	.882	-2.256792	5.770649
	4	7.0853947	0.9745920	.002	2.956048	11.214742
	6	9.4915000	0.9921325	.000	5.403857	13.579143

*cont.*

cont.

(I) ESTRUTURA2	(J) ESTRUTURA2	DIFERENÇA MÉDIA (I-J)	DESVIO PADRÃO	SIG.	95% INTERVALO DE CONFIANÇA	
					LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
6	1	-2.4490000	0.4694302	.001	-4.058900	-.839100
	2	-22.9540000	1.0791372	.000	-26.409704	-19.498296
	3	-7.7345714	0.5558621	.000	-9.446454	-6.022689
	4	-2.4061053	0.2914026	.000	-3.308670	-1.503541
	5	-9.4915000	0.9921325	.000	-13.579143	-5.403857

**Resultado:** As seis estruturas comparadas têm calibres diferentes, excepto:

- Capilares da estria vascular e do ligamento espiral (1-4)
- Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna = Arteriolas da parede externa da espira basal  $<10\ \mu\text{m}$  (3-5)

#### 4.7. TESTES NÃO-PARAMÉTRICOS

##### 1. O calibre das seis estruturas são iguais?

**Hipótese:** O calibre das seis estruturas são idênticos.

**Teste:** Kruskal-Wallis (não paramétrico)

Estatística Kruskal-Wallis (H)	122.1763
df	5
p	0.000

**Resultado:** Existem diferenças de calibre estatisticamente muito significativas ( $p < 0.01$ ) entre as seis estruturas.

## 2. O calibre entre cada par de estruturas é igual?

**Hipótese:** Para cada par de estruturas comparadas os calibres são iguais.

**Teste:** Mann-Whitney U (não paramétrico)

PAR COMPARADO	DIFERENÇA	CRITÉRIO	SIG
-	-	-	-
estrutura1-estrutura2	78.20	22.58	sim
estrutura1-estrutura3	40.19	23.87	sim
estrutura1-estrutura4	3.29	27.48	não
estrutura1-estrutura5	50.08	23.45	sim
estrutura1-estrutura6	33.88	37.95	não
estrutura2-estrutura1	78.20	22.58	sim
-	-	-	-
estrutura2-estrutura3	38.01	18.69	sim
estrutura2-estrutura4	81.49	23.13	sim
estrutura2-estrutura5	28.13	18.15	sim
estrutura2-estrutura6	112.08	34.93	sim
estrutura3-estrutura1	40.19	23.87	sim
estrutura3-estrutura2	38.01	18.69	sim
-	-	-	-
estrutura3-estrutura4	43.47	24.39	sim
estrutura3-estrutura5	9.89	19.74	não
estrutura3-estrutura6	74.07	35.78	sim
estrutura4-estrutura1	3.29	27.48	não
estrutura4-estrutura2	81.49	23.13	sim
estrutura4-estrutura3	43.47	24.39	sim
-	-	-	-
estrutura4-estrutura5	53.36	23.98	sim
estrutura4-estrutura6	30.59	38.28	não
estrutura5-estrutura1	50.08	23.45	sim
estrutura5-estrutura2	28.13	18.15	sim
estrutura5-estrutura3	9.89	19.74	não

*cont.*

cont.

PAR COMPARADO	DIFERENÇA	CRITÉRIO	SIG
estrutura5-estrutura4	53.36	23.98	sim
-	-	-	-
estrutura5-estrutura6	83.96	35.50	sim
estrutura6-estrutura1	33.88	37.95	não
estrutura6-estrutura2	112.08	34.93	sim
estrutura6-estrutura3	74.07	35.78	sim
estrutura6-estrutura4	30.59	38.28	não
estrutura6-estrutura5	83.96	35.50	sim
-	-	-	-

**Resultado:** As seis estruturas comparadas têm calibres estatisticamente diferentes, excepto:

- Capilares da estria vascular e do ligamento espiral = Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe <10 µm (1-4-6)
- Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna = Arteriolas da parede externa da espira basal <10 µm (3-5)

#### 4.8. CONCLUSÃO

Existem diferenças de calibre estatisticamente muito significativas entre as seis estruturas comparadas, detectadas quer por testes paramétricos (One-Way ANOVA) quer por testes não paramétricos (Kruskal-Wallis).

A diferença de calibres entre pares de estruturas depende ligeiramente do teste implementado (paramétrico: Tamahane e não-paramétrico: Mann-Whitney).

Ambos os testes indicam que o calibre das «arteriolas, radiárias internas na sua emergencia» é estatisticamente maior do que o das restantes 5 estruturas.

Todas as estruturas têm calibres diferentes, com a excepção:

- Capilares do ligamento espiral e da estria vascular <10 µm = «Capilares da rede espiral interna».



- «Arteriolas pré-capilares da rede espiral interna» = «Arteriolas da parede externa da espira basal  $<10\ \mu\text{m}$ ».

Mas o teste de Mann-Whitney, ao contrário do teste de Tamhance, indica ainda que:

- «Capilares do ligamento espiral e da estria vascular  $<10\ \mu\text{m}$ » = «Capilares da rede espiral interna» = «Capilares constituintes dos glomérulos de Schwalbe  $<10\ \mu\text{m}$ ».

Conclui-se pelo presente estudo estatístico que os valores de calibre das redes capilares constituintes da rede espiral interna e dos glomérulos de Schwalbe, pertencentes à parede interna da cóclea são semelhantes aos capilares do ligamento espiral e da estria vascular, pertencentes à parede externa da cóclea.

## 5. DISCUSSÃO

A microvascularização do ouvido interno está intimamente relacionada com a função coclear.

Este trabalho é relevante, pois com a tecnologia e estado do conhecimento actuais, não é possível realizar no humano estudos de fluxo, *in vivo*, que ilustrem a microvascularização da cóclea.

É fundamental criar padrões vasculares normais no modelo experimental. Os dados obtidos servirão de controlo normal em futuros estudos da cóclea de natureza experimental, química, física ou metabólica.

O facto de a cóclea estar envolvida por tecido ósseo particularmente compacto condiciona o seu acesso, quer cirúrgico quer experimental.

Sómente técnicas de estudo sofisticadas permitem obter resultados fidedignos no estudo da microvascularização.

Este tema tem sido objecto de estudo por investigadores conceituados, que ao longo dos tempos têm aprofundado o conhecimento utilizando técnicas de sofisticação crescente.

Neste estudo o objetivo foi reproduzir os resultados anteriores obtidos e estabelecer um padrão morfométrico sistematizado das várias estruturas vasculares arteriais existentes.

## I-QUESITO DE INVESTIGAÇÃO

- *As técnicas de estudo utilizadas foram ou não adequadas ao estudo proposto?*
- *O seu manuseamento foi correcto e foram seguidos de modo correcto os vários passos nomeadamente na técnica de microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares?*

O objectivo primordial inicial foi o de adequar a metodologia de estudo ao órgão a estudar e também aprimorar as técnicas de estudo no sentido de que os resultados obtidos fossem isentos de artefactos.

Previamente à injeção foi realizada perfusão de heparina para minimizar a formação de coágulos.

A técnica de microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares permite a observação da rede vascular em termos tridimensionais.

Todo o procedimento que precede a injeção vascular é extraordinariamente importante, e no presente estudo foram cumpridos todos os passos considerados essenciais e que serão discutidos de modo hierarquizado:

### *a) Lavagem do leito vascular.*

Este é um passo fulcral do procedimento técnico, devendo adequar-se à espécie a estudar.

Como se tratava de estudar vertebrados da classe dos mamíferos, poder-se-ia fazer lavagem do leito vascular com cloreto de sódio ou lactato de Ringer. No protocolo seguido a lavagem do leito vascular foi feita com perfusão de cloreto de sódio, com osmolaridade de 0,15 M.

### *b) Fixação vascular*

Nesta fase foi importante considerar o tipo de fixador, o uso, ou não, de tamponamento e qual o tampão usado, qual o pH e a osmolaridade do fixador e qual a duração do processo.

O fixador utilizado no estudo foi o glutaraldeído a 2,2%, tamponado com difosfato com pH=7,4, com osmolaridade superior a 220 mOsm, tal como preconizado nos mamíferos em geral.

c) *Injecção*

A injeção foi feita com pressão manual e não com bomba infusora, que por vezes é de difícil adaptação a pequenos animais. Dada a grande experiência em injeção vascular de vários órgãos, os resultados obtidos permitem concluir que a pressão foi adequada.

Foi usado um cateter polivinílico, cujo calibre melhor se adaptava ao vaso a injectar e a sua fixação foi feita com fio de seda.

d) *Produto a injectar para moldes de corrosão*

Para correcta obtenção dos moldes um dos passos essenciais é a escolha do produto de injeção (Lametschwandtner e al., 1990)<sup>[107]</sup>

O produto ideal para este tipo de estudo deve possuir propriedades especiais.

Os parâmetros a cumprir de acordo com vários autores, foram integralmente respeitados.

*Toxicidade do produto:* deve ser isento de toxicidade para quem o manuseia.

*Viscosidade do produto:* a viscosidade deve ser tal que passe os capilares de menor diâmetro entre 5 e 7  $\mu\text{m}$ .

*Inércia do produto:* para poder constituir um molde o produto deve ser inerte.

*Retracção,* durante a polimerização não deverá ocorrer alteração do molde ou retracção do seu volume.

*Rapidez de polimerização:* a polimerização deverá ser rápida e não exceder, de acordo com os vários autores, os 15 minutos.

O produto a injectar deverá deixar as estruturas circundantes intactas possibilitando assim a sua microdissecção.

O produto a injectar deverá resistir à corrosão sem alteração da sua configuração espacial e sem alteração na consistência dos moldes vasculares.

Deverá ser um bom condutor de electrões, resistindo simultaneamente ao bombardeamento de electrões durante o manuseio no microscópio electrónico.

Deverá replicar as estruturas endoteliais dos vasos permitindo a distinção entre artérias cujos núcleos têm disposição ovalada ou elipsoidal e veias que apresentam núcleos arredondados.

Até à data a resina que mais se aproxima deste modelo ideal é o *Mercox*® e foi este o produto utilizado.



Estando enunciados os requisitos essenciais desta técnica discutir-se-á de forma breve a opção pela resina comercial *Mercox*® *C12B* resina pré-polimerizada fabricada pela *Vilene*-Japão, que foi utilizado respeitando na íntegra o protocolo de injeção.

O *Mercox C12B* foi armazenado a + 4 °C de molde a conservar as suas propriedades e evitar polimerização.

Este produto foi manuseado em local bem ventilado, pois liberta esteres voláteis, sendo o seu uso feito com luvas protectoras para minimizar os riscos de sensibilização da pele do investigador.

No início da injeção adicionou-se o monómero catalisador devendo o produto final ser injectado de imediato, uma vez que a polimerização se inicia imediatamente após a junção dos dois produtos.

Todos os passos desta técnica foram escrupulosamente cumpridos segundo o protocolo de estudo.

Existe um passo que, pela sua importância, merece ser discutido:

Trata-se da montagem do objecto, no *stub* ou porte objectos do microscópio.

A montagem deve respeitar o correcto posicionamento da peça a estudar mantendo simultaneamente a possibilidade de estudo tridimensional da mesma.

O excelente método que Lamethschwandtner introduziu de pontes condutoras, *conductive bridges*, satisfaz ambos os requisitos.

Previamente a este método realizava-se a fixação da peça com cola que, ao fixar a peça, eliminava de imediato uma zona a estudar.

O presente método ao criar como meio de fixação dos moldes vasculares, finas pontes de cobre ou até cabelos humanos, para peças muito pequenas, que se dispõem em ponte entre estas e o porta-objectos, torna o estudo mais completo por maior acessibilidade a diferentes regiões dos moldes vasculares.

Este método que requer grande perícia de manuseamento, tem a vantagem de permitir posterior reposicionamento da peça sem destruição do molde vascular.

Todas as restantes técnicas são já amplamente conhecidas e foi por vezes difícil, mas no geral bem conseguido, a adaptação de cada uma delas ao estudo da cóclea.

## II-QUESITO DE INVESTIGAÇÃO

- *Quais as mais relevantes contribuições deste estudo para o conhecimento da micro-vascularização arterial da cóclea no Cobaio?*

Embora o papel da microcirculação na patologia coclear seja indiscutível, a fisiopatologia é em muitos aspectos, ainda insuficientemente esclarecida.

Nos estudos de fluxometria, é extraordinariamente difícil a distinção exacta entre as estruturas da parede interna da cóclea, modíolo, gânglio espiral, lâmina basilar e as estruturas da parede externa nomeadamente estria vascular e ligamento espiral.

A morfologia arteriolar e capilar de cada uma destas estruturas com as diferentes técnicas usadas até agora, está insuficientemente estudada no que refere às suas características, nomeadamente trajecto e calibre vasculares.

No sentido de esclarecer estes aspetos, far-se-á a análise de algumas destas estruturas, comparando a nossa casuística com os resultados obtidos por autores anteriores e enfatizando o que de inovador se evidenciou.

### *Artéria espiralada*

No que respeita à sua emergência os resultados são consentâneos com os referidos por autores anteriores, no que respeita ao trajecto e ao calibre, considerando as várias espiras da cóclea e a progressiva diminuição de calibre.

Considerando os autores precedentes, a representação da artéria espiralada ao longo da cóclea com a técnica de diafanização permitiu um detalhe da relação da artéria com o modíolo e a lâmina espiral óssea talvez ainda não conseguido em termos de iconografia.

### *Ramos colaterais*

As arteríolas radiárias internas e externas atingem neste estudo grande riqueza de descrição e pormenor, tendo já sido objecto de trabalhos anteriores por outros autores.

Por outro lado, no que respeita ao estudo dos ramos colaterais da artéria espiralada, procedeu-se à evidência dos *vasa vasorum* arteriais e dos *vasa nervorum* e do seu trajecto recorrente em direcção à artéria espiralada e ao nervo coclear com várias técnicas de estudo o que proporcionou um grau de evidência destas estruturas ainda não atingido.

A caracterização das arteríolas e redes capilares das paredes interna e externa da cóclea é de grande importância morfológica e funcional, estabelecendo a relação com a actividade funcional em cada uma destas regiões.

Ao nível da parede interna da cóclea, os trabalhos evidenciam os glomérulos de Schwalbe, como verdadeiras estruturas capilares modeladoras do fluxo sanguíneo coclear permitindo uma maior superfície de troca das redes capilares com as estruturas sensorineurais do modíolo e da parede interna.

Os glomérulos originam-se em arteríolas de terceira ordem que se ramificam em arteríolas pré-capilares que se dividem em capilares, de 7 µm em média de calibre, formando redes capilares largas e apresentando por vezes esta disposição glomerular mais complexa, que promove a regulação do fluxo coclear perto das estruturas sensorineurais da lâmina espiral.

### III-QUESITO DE INVESTIGAÇÃO

- *Existe um mecanismo de regulação da microvascularização coclear?*

Considerando o papel dos pericitos no controlo do fluxo sanguíneo coclear, foi importante realçar e ilustrar a sua existência no ligamento espiral. Estes observaram-se em grande quantidade no ligamento espiral.

Os pericitos desempenham um importante papel na contractilidade vascular, segundo Donoghue em 2006<sup>[108]</sup>, Kawamura et al 04<sup>[109]</sup>, Yamanishi 2006<sup>[110]</sup>.

Em estudos de microscopia de fluorescência, Shi Xiaui, 2008<sup>[111]</sup>, sublinha a sua localização e descreve a distribuição heterogénea nos capilares do ligamento espiral e nos capilares da estria vascular. O estudo que efectuou, por imunofluorescência e imunocitoquímica com proteínas marcadoras dos pericitos permitiram identificar que enquanto no ligamento espiral estes expressam a conexina 40, a tropomiosina e a

desmina, na estria vascular os pericitos são positivos para a desmina mas não para a tropomiosina.

Comparando o papel dos pericitos na microvascularização cerebral e o seu papel na contractilidade microvascular e na manutenção da barreira hematoencefálica, sendo a cóclea um órgão extraordinariamente vulnerável à hipoxia e sendo a sua parede interna, na proximidade das células ciliadas, metabolicamente tão exigente sobretudo quando da exposição prolongada ao som, percebe-se facilmente o papel dos pericitos.

É igualmente muito relevante a função dos pericitos como agentes reguladores do fluxo coclear na parede externa, em relação com estruturas fundamentais à manutenção do potencial endococlear, como o ligamento espiral e a estria vascular.

A descrição dos pericitos no presente estudo está em concordância com os trabalhos mais recentes sobre fluxo sanguíneo coclear de Shi Xiaui e Dai (Shi Xiaui et al., 2008; Dai et al., 2009)<sup>[111][112]</sup>.

A presença dos pericitos em íntima relação com a microvascularização das estruturas constituintes da parede interna e externa da cóclea parece traduzir um mecanismo de controlo do fluxo sanguíneo coclear nas várias regiões da cóclea.

#### IV-QUESITO DE INVESTIGAÇÃO

- *O que permite concluir a morfometria para determinação do calibre da microvascularização arterial da cóclea, considerando a microvascularização da parede interna e da parede externa da cóclea?*

Foi estudada a morfometria dos vasos arteriais da parede interna e da parede externa da cóclea.

*J. A. Esperança-Pina em 2007<sup>[106]</sup> adoptou uma classificação para vasos de calibre inferior a 200  $\mu\text{m}$ , como constituindo o sistema microvascular, classificando-os em diferentes tipos:*

*Artérias de pequeno calibre, com calibres superiores a 200  $\mu\text{m}$ .*

**Arteriolas de 1.<sup>a</sup> ordem**, com calibres compreendidos entre 200 e 100  $\mu\text{m}$ .

**Arteriolas de 2.<sup>a</sup> ordem**, com calibres compreendidos entre 100 e 30  $\mu\text{m}$ .

**Arteriolas pré-capilares**, arteriolas terminais ou metarteriolas, com calibres compreendidos entre 30  $\mu\text{m}$  e o calibre dos canais preferenciais e capilares.

**Canais preferenciais**, com calibres compreendidos entre 10 e 15  $\mu\text{m}$ .

**Capilares**, com calibres compreendidos entre 5 e 12  $\mu\text{m}$ .

**Vénulas pós-capilares**, com calibres compreendidos entre o calibre dos capilares e 30  $\mu\text{m}$ .

**Vénulas de 2.<sup>a</sup> ordem**, com calibres compreendidos entre 30 e 100  $\mu\text{m}$ .

**Vénulas de 1.<sup>a</sup> ordem**, com calibres compreendidos entre 100 e 200  $\mu\text{m}$ .

**Anastomoses arteríolo-venulares**, com calibre entre 20 e 30  $\mu\text{m}$ .

Como referiu J. A. Esperança-Pina (2007) em Anatomia Humana do Coração e Vasos, na classificação dos vasos com calibres inferiores a 200 $\mu\text{m}$  em cortes diafanizados e em microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares<sup>[106]</sup>, citado por Goyri-O'Neill, J.<sup>[94][101]</sup>, Correia, M.<sup>[99]</sup>, Bernardes, A.<sup>[113]</sup>, Pais, D.<sup>[100][104]</sup>, Bettencourt Pires, A.<sup>[103]</sup>, O'Neill, A.<sup>[114]</sup>, Guedes da Silva, J.<sup>[105]</sup>. Este autor fez escola, sendo o autor que melhor classificou a microvascularização não só do coração como de outros órgãos a nível mundial.

Com efeito, realizou ou foram realizados sob a sua orientação, diversos estudos sobre a microvascularização em animal e no humano em que esta classificação foi utilizada.

No presente trabalho, foi também esta, a classificação utilizada não só por já ter sido utilizada em trabalhos anteriores mas também por ser uma classificação coerente com os padrões morfológicos e que permite rever a microvascularização de uma forma sistemática.

Importou neste estudo verificar quais as semelhanças em termos de calibre de estruturas análogas, na parede interna e na parede externa da cóclea, com particular incidência na rede capilar.

Do estudo estatístico realizado com testes paramétricos de Tamahane e não paramétricos de Mann-Whitney, verifica-se que comparando todas as estruturas consideradas estas têm calibres diferentes, com excepção dos capilares da estria vascular e do ligamento espiral, pertencentes à parede externa da cóclea que têm calibres iguais aos capilares da rede espiral interna e aos capilares da parede interna da cóclea, dependentes das arteriolas da rede espiral interna. Estas, pela sua morfometria, verificam-se ser arteriolas de 3.<sup>a</sup> ordem ou arteriolas pré-capilares.

As arteríolas da rede espiral interna, da parede interna da cóclea têm calibre igual às arteríolas da parede externa da cóclea ao nível da espira basal da cóclea.

Aplicando o teste de Mahn-Whitney verifica-se ainda que os capilares da rede espiral interna, são semelhantes aos capilares dos glomérulos de Scwalbe, ambos pertencentes à parede interna da cóclea.

Quando comparados com os capilares da parede externa, capilares da estria vascular e do ligamento espiral, o seu calibre é também semelhante.

Demonstrou-se com o presente estudo uma homogeneidade de calibres das redes capilares da parede interna e externa da cóclea que contribui para uma homeostasia perfeita em regiões funcionalmente distintas.

### V-QUESITO DE INVESTIGAÇÃO

- *Em síntese qual a contribuição do presente trabalho para o conhecimento da fisiologia e anatomia microvascular da cóclea?*

Procede-se a uma breve descrição da embriologia, anatomia e fisiologia coclear à luz da biologia do desenvolvimento, da localização espacial da cóclea e do determinismo dos campos morfogenéticos no seu desenvolvimento e função.

A transdução coclear, mecanismo que converte a onda sonora em estímulos sonoros aferentes ao nervo auditivo está intimamente relacionada com a microvascularização arterial da cóclea. A isquémia coclear acompanha-se de imediato de perda auditiva.

O diferente tipo de lesão coclear que leva à surdez de tipo sensorioneural está bem estudada na presbiacúsia podendo estabelecer-se uma relação objectiva com o padrão audiométrico.

A hipoacúsia de tipo sensorial, está intimamente relacionada com a degenerescência do órgão espiral de Corti e lesão das células ciliadas externas ao nível da base da cóclea. Tendo em mente a tonotopia coclear com localização dos sons agudos ao nível da base da cóclea, facilmente se explica o padrão audiométrico com perda nas altas frequências.

A hipoacúsia de tipo neural, caracteriza-se por perda neuronal, com perda importante de aferências neuronais, com tradução audiométrica numa curva gradualmente descendente, com atingimento importante da discriminação auditiva.



Otte e colaboradores, em estudos realizados, evidenciaram cerca de 5 a 10% de perda neuronal por cada dez anos de vida na espécie humana.

A hipoacúsia de tipo metabólico resulta da atrofia da estria vascular, com consequente alteração do potencial da endolinfa por diminuição das células da estria vascular e alteração do mecanismo de reciclagem de  $K^+$ . Verifica-se ainda alteração da morfologia do ligamento espiral com tradução em curva audiométrica aplanada com perdas em todas as frequências.

Estando caracterizados os tipos de hipoacúsia de causa coclear inquirimo-nos em que medida é que a microvascularização arterial, considerando não só a cóclea no seu conjunto mas as diferentes regiões da parede interna e da parede externa da cóclea, contribui para este tipo de alterações.

É apresentada toda a morfologia coclear em microscopia electrónica de varrimento com particular destaque para a cóclea óssea e membranosa.

Na parede interna da cóclea são analisadas as estruturas intramodiolares como o gânglio espiral, a morfologia dos corpos celulares e dos seus axónios.

A morfologia do órgão espiral de Corti é descrita em pormenor, com descrição e grande riqueza de pormenor das células ciliadas internas e externas.

É em seguida apresentado o estudo da microvascularização propriamente dita.

A artéria modiolar espiralada é visualizada com a técnica de diafanização e com a técnica de microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares, o seu trajecto flexuoso ao longo do modiolo, o seu calibre que diminui em cada uma das espiras após emergência dos seus ramos colaterais de maior relevância, as arteríolas radiárias internas e as arteríolas radiárias externas e a sua terminação junto ao ápice da cóclea num padrão de vascularização terminal.

São visualizados os vasa vasorum arteriais e os vasa nervorum com uma riqueza de pormenor ainda não exibida em estudos microvasculares.

É detalhada toda a microvascularização dependente das arteríolas radiárias internas. Estas, originam-se no flanco da artéria modiolar espiralada em número de dez a doze em cada espira, sendo extraordinariamente flexuosas e vascularizam através dos seus ramos colaterais a parede interna da cóclea e as estruturas sensoriais que aí se situam, como o gânglio espiral e as estruturas de proximidade do órgão espiral de Corti.

O seu calibre que se situa por vezes acima dos 20  $\mu m$  na espira basal, na segunda espira diminui com valores entre 12 e 20  $\mu m$ , decrescendo o calibre, progressivamente, até ao ápex da cóclea. Ao ascender no modiolo ou ainda no seu trajecto na lâmina

espiral óssea formam ansas vasculares, por vezes de calibre constante ao longo deste, e dividem-se, sem apresentar constrições vasculares nos pontos de ramificação, originando novas ansas vasculares de calibre inferior à arteríola de origem.

As arteríolas radiárias internas originam como ramos colaterais, vários grupos de arteríolas de menor calibre, que vascularizam distintas regiões da parede interna da cóclea, as arteríolas do gânglio espiral, as arteríolas da rede espiral interna, as arteríolas de origem dos glomérulos de Schwalbe e a arteríola da lâmina basilar.

Os glomérulos de Schwalbe desempenham um importante papel funcional como *relay-stations*, em termos hemodinâmicos, da microvascularização coclear.

As arteríolas radiárias externas têm a sua origem na artéria modiolar espiralada, dirigem-se para a parede externa da cóclea e percorrem a parede superior da rampa vestibular de cada uma das espiras.

Acima da inserção da lâmina vestibular ou de Reissner na parede externa, as arteríolas radiárias externas emitem as arteríolas supra-estriadas e depois as arteríolas do ligamento espiral que vascularizam o ligamento espiral e a estria vascular. As arteríolas radiárias externas dividem-se em vários ramos arteriulares de menor calibre, ao longo da convexidade do limite externo do ligamento espiral. O ligamento espiral forma uma malha de tecido conjuntivo com função de sustentação do epitélio altamente especializado que constitui a estria vascular. Identificaram-se pericitos em todo o ligamento espiral que atestam grande actividade metabólica.

Junto à sua base dispõe-se uma rede microvascular formada por arteríolas pré-capilares e capilares, a rede vascular *post-estriada* a qual se divide junto à estria vascular numa rede exclusivamente formada por capilares, a rede capilar *ad-estriada* junto à estria vascular.

A estria vascular, o único epitélio vascularizado do corpo humano, desempenha uma importante função, formando uma barreira hemato-labirintica para manutenção do potencial endococlear e transporte de iões, fundamental para o mecanismo de transdução das células ciliadas.

A espira basal da cóclea tem como característica particular apenas a esta espira, o facto de estar localizada na sua parede exterior a região das janelas. A janela redonda que dá acesso à rampa timpânica da cóclea e a janela oval que se relaciona com o vestíbulo.

Em termos anátomo-fisiológicos esta espira é aquela que é metabolicamente mais exigente. É nesta espira que se realiza a transdução dos sons agudos.

Pelo seu papel na tonotopia coclear as estruturas da parede interna e da parede externa da cóclea, são nesta região particularmente vulneráveis à hipóxia.

Embora a complementariedade de todas as técnicas tenha sido importante para a reconstrução tridimensional da microvascularização da cóclea, a técnica de microscopia electrónica de varrimento sobretudo quando foi usado o sistema *SEMAfore* permitiu realizar a rigorosa morfometria de todas as estruturas vasculares. No caso particular das redes capilares da parede interna e externa da cóclea esta técnica permitiu caracterizar em termos morfométricos cada uma delas.

O tratamento estatístico dos valores morfométricos permitiu caracterizar cada uma destas redes, concluindo-se que os capilares constituintes da parede interna e da parede externa da cóclea têm calibres semelhantes.

Assim, embora situados em regiões cocleares distintas com diferente papel funcional na fisiologia coclear, estas redes são constituídas por capilares de igual calibre. Do exposto infere-se que o mecanismo de controle do fluxo sanguíneo coclear é tão importante na parede interna como na parede externa da cóclea.

## 6. CONCLUSÕES

A alteração do fluxo sanguíneo coclear afecta todo o mecanismo de oxigenação e aporte de metabólitos essenciais à manutenção da função da cóclea.

É bem conhecida a importância da alteração da microvascularização coclear em patologia otológica, hipoacusia por doenças metabólicas, trauma acústico, surdez súbita, presbiacusia e outras situações de hipoacusia.

As regiões da cóclea são metabolicamente muito exigentes embora com diferente função. A parede interna da cóclea é fundamental para a nutrição de todas as estruturas sensorineurais desta região, com particular destaque para o gânglio espiral de Corti e para as regiões próximas ao órgão espiral de Corti, órgão de tão grande importância funcional na manutenção da homeostasia dos líquidos labirínticos. A importância do estudo das redes capilares destas regiões reveste, consequentemente, a maior importância.

Está assim amplamente justificado o estudo de toda a microvascularização coclear e o estudo comparativo das redes capilares da parede interna e da parede externa da cóclea.

Foi detalhado não só o trajecto vascular, mas ainda pela observação dos modelos vasculares tridimensionais, em peças sujeitas a corrosão incompleta, a relação espacial das arteríolas com as estruturas de suporte do modíolo e da lâmina espiral.

Embora a complementaridade de todas as técnicas tenha sido importante para a reconstrução tridimensional da microvascularização da cóclea, a técnica de microscopia electrónica de varrimento, sobretudo quando foi usado o sistema *SEMAfore*, permitiu realizar a rigorosa morfometria de todas as estruturas vasculares.

Para além da demonstração iconográfica da microvascularização coclear, em todas as estruturas constituintes da cóclea, o estudo das redes capilares, evidenciando um padrão exuberante onde se observam inúmeras anastomoses intercapilares complexas, é claramente demonstrativo de um padrão de vascularização

terminal, em que existe um mecanismo protector contra situações que poderiam resultar em menor perfusão arterial com prejuízo funcional.

No caso particular das redes capilares da parede interna e externa da cóclea, o tratamento estatístico dos valores morfométricos permitiu caracterizar cada uma destas redes, concluindo-se que os capilares constituintes da parede interna e da parede externa da cóclea têm calibres semelhantes.

Assim embora situados em regiões cocleares distintas, com diferente papel funcional na fisiologia coclear, estas redes são constituídas por capilares de igual calibre o que traduz um mecanismo de controlo do fluxo sanguíneo coclear tão importante na parede interna como na parede externa da cóclea.

É provavelmente esta a mais importante conclusão do presente trabalho.

É grande a importância funcional da base da cóclea, a caracterização e a ilustração do padrão de microvascularização na espira basal, região metabolicamente tão exigente está bem documentada.

Embora já realçado o papel da vascularização na região da janela redonda, a distribuição da microvascularização arterial a este nível é extraordinariamente complexa.

Demonstrou-se, de forma inédita, o trajecto das arteríolas mergulhando na rampa timpânica, observando-se no interior desta uma multiplicidade de arteríolas pré-capilares, que se dividem a este nível em redes capilares que penetram a própria rampa timpânica. O estudo do ouvido interno e particularmente da cóclea, entrou numa nova era com a realização da cirurgia de implantação coclear para reabilitação da surdez.

Este estudo permitiu imagens inéditas da janela redonda e do inicio da rampa timpânica, tornando a realidade da microvascularização coclear mais fascinante para quem trabalha no universo complexo que é a surdez.

Novos resultados levantam novas questões, existindo seguramente um manancial de situações experimentais que poderão ser estudadas usando este modelo animal. O seu estudo executado com todo o rigor e alicerçado em resultados fidedignos permitirá empreender no futuro novos caminhos.



## 7.

### RESUMO

Na descrição deste estudo foi utilizada a terminologia anatómica da Sociedade Brasileira de Anatomia adaptada ao português por J. A. Esperança-Pina de acordo com o tratado Anatomia Humana da Relação.

Os actuais estudos sobre hipoacusia sensorineural implicam um grupo crescente de situações, em que a lesão se situa ao nível da microvascularização coclear, daí que o conhecimento exacto da angiomorfologia normal se torne essencial na fase actual do conhecimento.

A autora tem vindo a estudar, desde 1986, a angiomorfologia do ouvido Interno no modelo experimental, o Cobaio, utilizando várias técnicas microvasculares. sendo dado ênfase particular neste estudo à técnica de microscopia electrónica de varrimento em moldes vasculares.

Os animais usados no presente estudo pertencem à espécie *cavia porcellus*, cobaio, por serem considerados na comunidade científica internacional como o melhor modelo experimental para estudo do ouvido interno, pelo facto de a morfologia coclear ser muito semelhante à do Homem e por isso ser um modelo fiável para cirurgia experimental e microdissecção. Este estudo foi realizado em 100 cobaios, *cavia porcellus*, de ambos os sexos com peso médio de 450g.

A vascularização do ouvido interno, no cobaio como no homem, faz-se através dos ramos de divisão da artéria auditiva interna ou labiríntica. A artéria labiríntica origina-se como ramo colateral da artéria cerebelosa ântero-inferior a qual tem origem na artéria basilar ou na artéria vertebral.

Embora no homem a artéria auditiva interna possa também destacar-se da artéria basilar e até da artéria vertebral, no cobaio em todos os casos estudados a sua origem verificou-se sempre na artéria cerebelosa ântero-inferior.

A artéria labiríntica, ao passar abaixo do meato auditivo interno, divide-se na artéria vestibular anterior e na artéria coclear comum.

A artéria vestibular anterior dirige-se para o nervo vestibular, emite *vasa nervorum* para este nervo e vasculariza o utrículo e os canais semicirculares.

A artéria coclear comum origina dois ramos principais, a artéria vestibulo-coclear ou vestibular posterior no cobaio, a qual se destaca junto à espira basal da cóclea e a artéria coclear, como ramo terminal, que passa a denominar-se de artéria modiolar ou espiralada, após entrar no modíolo.

A artéria modiolar ascende no modíolo promovendo através dos seus ramos colaterais e dos seus ramos terminais a microvascularização coclear, numa vascularização de órgão de tipo terminal. Ao longo do seu trajecto verificou-se de modo constante uma redução gradual de calibre em cada uma das espiras, por emissão de ramos colaterais, sendo que o calibre da artéria na base da cóclea apresenta um valor que diminui gradualmente até ao ápice.

A artéria modiolar origina em todo o seu trajecto ramos colaterais, cujo número diminui em valor absoluto da base para o ápice:

Arteriolas radiárias internas, arteriolas de trajecto flexuoso que caminham junto às estruturas sensorioneurais da parede interna da cóclea, junto ao lábio timpânico da lâmina espiral óssea e na parede do próprio modíolo, que se relacionam intimamente com este. As arteriolas radiárias internas originam-se no flanco da artéria modiolar espiralada. Contam-se dez a doze em cada espira, extraordinariamente flexuosas desde a sua origem. As arteriolas radiárias internas originam como ramos colaterais, vários grupos de arteriolas de menor calibre, que vascularizam distintas regiões da parede interna da cóclea, as arteriolas do gânglio espiral, a rede espiral interna, as arteriolas de origem dos glomérulos de Schwalbe e a arteríola da lâmina basilar. As arteriolas radiárias externas importantes ramos colaterais da artéria modiolar espiralada promovem a vascularização de importantes estruturas da parede externa. Ao atingir o limite externo do ligamento espiral, as arteriolas radiárias externas dividem-se em vários ramos arteriulares de menor calibre, ao longo da convexidade do limite externo do ligamento espiral, originando a rede capilar pós-estriada que ocupa a porção lateral do ligamento espiral e a rede capilar ad-estriada, na sua porção mais medial em íntima relação com a estria vascular.

A espira basal da cóclea apresenta grande riqueza de vascularização, com características particulares apenas a esta espira, a qual é metabolicamente a mais exigente.

A arteríola da janela da cóclea aborda a janela da cóclea pela sua convexidade e divide-se numa rica rede vascular da qual emergem arteriolas pré-capilares que se

ramificam em capilares, os quais se dirigem em profundidade penetrando a rampa timpânica da cóclea ao nível da espira basal.

Importou neste estudo verificar quais as semelhanças em termos de calibre de estruturas análogas, na parede interna e na parede externa da cóclea, com particular incidência na rede capilar.

Do estudo estatístico realizado com testes paramétricos de Tamahane e não paramétricos de Mann-Whitney, verifica-se que comparando todas as estruturas consideradas estas têm calibres diferentes, com excepção dos capilares da estria vascular e do ligamento espiral, pertencentes à parede externa da cóclea que têm calibres iguais aos capilares da rede espiral interna e aos capilares da parede interna da cóclea, dependentes das arteríolas da rede espiral interna.

As redes capilares dependentes das arteríolas radiárias internas que vascularizam as estruturas sensorioneurais junto à parede interna do modíolo são em tudo semelhantes em termos de calibre às redes capilares da parede externa da cóclea, incluindo os capilares da estria vascular.

Esta particularidade traduz num órgão com vascularização de tipo terminal, um mecanismo de controlo do fluxo sanguíneo coclear tão importante na parede interna como na parede externa da cóclea.

8.

ABSTRACT

Current studies on sensorineural hearing loss, imply a growing group of situations in which the lesion is located at the level of the cochlear microvasculature, hence the exact knowledge of normal angiomorfology becomes essential in current state of knowledge.

The author has been studying since 1986, the angiomorfology of inner on the experimental model, the *guinea pig*, using various microvascular techniques being given particular emphasis in this study to the results of the technique of scanning electron microscopy on corrosion casts.

The animals used in this study belong to the species *cavia porcellus*, guinea pig, to be considered in the international scientific community as the best experimental model for the study of the inner ear, the cochlear morphology is very similar to human and therefore a reliable model for experimental surgery and microdissection. This study was performed in 100 guinea pigs of both sexes with average weight of 450g.

There shall be a brief description of embryology, anatomy and cochlear physiology in the light of developmental biology, regarding also the spatial location of the cochlea and the determinism of morphogenetic fields in their development and function.

The cochlear transduction mechanism converts the sound wave in stimuli sound and so afferent auditory nerve fibres and deafness are closely related to the cochlear microvasculature. Cochlear ischemia is accompanied by immediate hearing loss. The different type of cochlear injury that leads to sensorineural deafness is well studied in presbycusis where an objective link with the audiometric pattern as been established.

**The sensory type of deafness**, is closely related to the degeneracy of the organ of Corti and damage to the outer hair cells at the basal turn of the cochlea.



Keeping in mind cochlear tonotopy with location of high frequency sounds at the level of the base of the cochlea, it explains the audiometric pattern with loss in high frequencies.

The **neural type of deafness**, is characterized by neuronal loss with loss of descendant important neuronal afferents, with audiometric translation on a gradually curve with important loss of auditory discrimination.

The **metabolic type of deafness** results in atrophy of the vascular stria, with consequent change in the potential of the endolymph by decreasing the vascular stria cells and changes in K<sup>+</sup> recycling mechanism. There is also a change in the morphology of the spiral ligament and the audiometric pattern as a flattened curve with loss at all frequencies.

Bearing in mind cochlear tonotopy and being characterized all types of sensorineural deafness, we may inquire to what extent the cochlear microvasculature, considering not only the cochlea as a whole but different regions of the inner wall and the outer wall of the cochlea, contributes to deafness.

We analysed the entire cochlear morphology on scanning electron microscopy with particular emphasis on bone and membranous cochlea. The inner wall of the cochlea and intramodiolar structures such as the spiral ganglion, the morphology of its cell bodies and their axons are analyzed.

The morphology of Corti's organ is described in detail, with description and large detail of the inner and outer hair cells.

Is then presented the study of the microvasculature itself.

The spiral modiolar artery is observed with the diaphanization technique and the technique of scanning electron microscopy on corrosion vascular casts.

After emergence of collateral branches of the greatest importance, the radiating internal and external arterioles, the modiolar artery gives rise to its terminal branches, the arterioles of the cochlear apex.

Arterial vasa vasorum and vasa nervorum are displayed with a great detail, which was not yet described in such detail in previous microvascular studies.

The arterial radiating arterioles originate in the flank of the spiral modiolar artery in number of ten to twelve in each loop, and they vascularize through their branches the inner wall cochlear sensorineural structures located in the modiolus as the spiral ganglion and structures near the organ of Corti.

Their caliber is above 20  $\mu\text{m}$  on the basal turn and in the second loop it decreases to values between 12 and 20  $\mu\text{m}$ , decreasing progressively to the apex of the cochlea.

They arise near the modiolus or on their way in the spiral lamina forming vascular loops, and divide without presenting vascular constrictions in their divisions, originating new vascular loops of lower caliber.

Internal radiating arterioles originate as collateral branches several groups of smaller caliber arterioles, which vascularize distinct regions of the inner wall of the cochlea namely, the arterioles of the spiral ganglion, the internal spiral network, the arterioles of origin of the glomeruli of Schwalbe and the arterioles of the basilar membrane.

The glomeruli of Schwalbe play an important functional role as relay-stations, in hemodynamic terms, to control the cochlear microvasculature.

External radiating arterioles have their origin in the spiral modiolar artery, they are directed towards the outer wall of the cochlea and run through the roof of the *scala vestibuli*.

Above the insertion of Reissner's membrane on the external wall the external radiating arterioles originate the spiral ligament arterioles, which vascularize the spiral ligament, they divide into several arteriolar branches of smaller caliber, along the convexity of the outer edge of the spiral ligament. The connective tissue of the spiral ligament forms a mesh with supporting function of the highly specialized epithelium, where pericytes were identifiable.

Next to its base there is the microvascular network of stria vascularis. The ad-striated vascular network which is divided into a capillary network, the capillary network of stria vascularis.

The stria vascularis, the only vascularized epithelium of the human body, plays an important role, forming an haemato-labyrinthine barrier to assure labyrinthine endocochlear potential and transport of ions, essential for the mechanism of transduction of external hair cells.

The cochlear basal turn has a special feature on its external wall, the region of the windows, the round windows giving access to *scala tympani* and the oval window that leads into *scala vestibuli*, and so it is metabolic demanding.

For their role in cochlear tonotopy the sensorineural structures and those of the external wall of the cochlea, are particularly vulnerable to hypoxia.

Although the complementarity of all the techniques was important for three-dimensional reconstruction of the microvasculature of the cochlea, the scanning electron microscopy technique, especially when we used the system Semafore was fundamental to perform precise morphometric measures regarding all vascular structures.

Regarding the capillaries of the inner and outer wall of the cochlea networks this technique allowed their characterization in morphometric terms.

To conclude the capillaries of the inner wall and of the external wall of the cochlea have similar size.

So although located at different cochlear regions, with a different functional role, in cochlear physiology these networks consist of capillaries of similar caliber.

It seems to translate a cochlear blood flow control mechanism that is so important in the inner wall as in and the external wall of the cochlea to provide for in inner ear homeostasis.

## 9.

# BIBLIOGRAFIA

1. Schuknecht HF, Watanuki K, Takahashi T, Belal AA, Jr., Kimura RS, Jones DD, et al. Atrophy of the stria vascularis, a common cause for hearing loss. *Laryngoscope*. 1974; 84(10):1777-821.
2. Schuknecht HF, Ishii T. Hearing loss caused by atrophy of the stria vascularis. *Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 1966;69(11):1825-33.
3. Schuknecht HF, Gacek MR. Cochlear pathology in presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1993;102(1 Pt 2):1-16.
4. Hachmeister JE. An abbreviated history of the ear: from Renaissance to present. *Yale J Biol Med*. 2003;76(2):81-6.
5. Lee KY. Pathophysiology of Age-Related Hearing Loss (Peripheral and Central). *Korean Journal of Audiology*. 2013;17(2):45-9.
6. Otte J, Schunknecht HF, Kerr AG. Ganglion cell populations in normal and pathological human cochleae. Implications for cochlear implantation. *Laryngoscope*. 1978;88(8 Pt 1):1231-46.
7. Zubern JM. (1987), *Catalogue Officiel Musée Egyptien du Cairo*. In: Cairo MEd, editor.
8. Zubern JM. (2005), Egipto: Taschen GmbH; 49 p.
9. Mudry AP, W. The ear in the visual arts of ancient Egypt. *The Mediterranean Journal of Otology*. 2006;3:81-9.
10. Carpiceci A. (2000), *Art and History of Egypt*. In.: Bonechi Books.
11. Naville E HH, Ayrton ER, Clarke S, Currelly CT. (1907). *The XIth dynasty temple at Deir el-Bahari: Egypt Exploration Fund*, London, Boston, Mass.
12. Allen JP. (2006), *The Art of Medicine in Ancient Egypt 2005-2006* ed: The Metropolitan Museum of Art; .
13. Breger C. (2006), *The 'Berlin' Nefertiti Bust*". In Regina Schulte. The body of the queen: gender and rule in the courtly world, 1500-2000.

14. Wang XH, Streeter M, Liu YP, Zhao HB. Identification and characterization of pannexin expression in the mammalian cochlea. *J Comp Neurol.* 2009;512(3):336-46.
15. Wood-Jones FWIC. The Development of the External Ear. *J Anat.* 1934(68):525-33.
16. Anson BJ, Bast TH, Richany SF. The fetal and early postnatal development of the tympanic ring and related structures in man. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1955;64(3):802-23.
17. Anson BJ, Winch TR, Warpeha RL, Donaldson JA. The blood supply of the otic capsule of the human ear, with special reference to that of the cochlea. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1966;75(4):921-44.
18. Anson BJ, Harper DG, Winch TR. The vestibular system. Anatomic considerations. *Arch Otolaryngol.* 1967;85(5):497-514.
19. Anson BJ, Donaldson JA, Warpeha RL, Winch TR. The surgical anatomy of the ossicular muscles and the facial nerve. *Laryngoscope.* 1967;77(8):1269-94.
20. Costa AC. (1950), *Manual de Embriologia*; Livraria Luso-Espanhola; 1950.
21. Bast TH. Development of the aquaeductus cochleae and its contained periotic duct and cochlear vein in human embryos. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1946;55:278-97.
22. Testut L. (1921), *Traité D'Anatomie Humaine.* 7. éd., rev., corr. et augm. ed. Paris 1921; 862 p.
23. Davies J. (1963), *Human Developmental Anatomy*; 298 p.
24. Avan P, Bonfils P, Loth D, Teyssou M, Trotoux J, Narcy P. [Study of the cochlea by evoked otoemissions. Physiological interpretation of results]. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac.* 1991;108(3):135-41.
25. Avan P, Bonfils P, Loth D, Narcy P, Trotoux J. Quantitative assessment of human cochlear function by evoked otoacoustic emissions. *Hear Res.* 1991;52(1):99-112.
26. Avan P, Bonfils P. [Anatomy and physiology of the cochlea]. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 1991;45(2):115-54.
27. Kley W. Alfonso Corti (1822-1876)-discoverer of the sensory end organ of hearing in Wurzburg. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 1986;48(2):61-7.
28. Erich, Kley W. [The most minute vascular supply in semicircular ducts]. *Zeitschrift fur Laryngologie, Rhinologie, Otologie und ihre Grenzgebiete.* 1952;31(11):528-36.
29. Von Békésy G. Similarities of inhibition in the different sense organs. *The American psychologist.* 1969;24(8):707-19.



30. Von Békésy G. Pressure and shearing forces as stimuli of labyrinthine epithelium. *Arch Otolaryngol*. 1966;84(2):122-30.
31. Von Békésy G. Inhibition and the time and spatial patterns of neural activity in sensory perception. *Transactions of the American Otological Society*. 1965;53:17-34.
32. Von Békésy G. Current status of theories of hearing. *Science*. 1956;123(3201):779-83.
33. Von Békésy G. Simplified Model to Demonstrate the Energy Flow and Formation of Traveling Waves Similar to Those Found in the Cochlea. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1956;42(12):930-44.
34. Von Békésy G. Subjective cupulometry; threshold, adaptation, and sensation intensity of the vestibular organ for rotations in the horizontal plane. *AMA Arch Otolaryngol*. 1955;61(1):16-28.
35. Von Békésy G. [Contribution on the question of frequency analysis in the cochlea]. *Arch Ohren Nasen Kehlkopfheilkd*. 1955;167(2-6):238-55.
36. Von Békésy G. Some electro-mechanical properties of the organ of Corti. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1954;63(2):448-68.
37. Zenner HP. Motile responses in outer hair cells. *Hear Res*. 1986;22:83-90.
38. Zenner HP. [Active movements of the hair cells: a new mechanism in hearing]. *HNO*. 1986;34(4):133-8.
39. Strelioff D, Sitko ST, Honrubia V. Role of inner and outer hair cells in neural excitation. *Trans Sect Otolaryngol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1976;82(3 Pt 1):322-5.
40. Honrubia V, Strelioff D, Sitko ST. Physiological basis of cochlear transduction and sensitivity. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1976;85(6 PT. 1):697-710.
41. Sitko ST, Strelioff D, Honrubia V. Source and maintenance of the endocochlear potential. *Trans Sect Otolaryngol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1976;82(3 Pt 1):328-35.
42. Flock AF, Strelioff D. Studies on hair cells in isolated coils from the guinea pig cochlea. *Hear Res*. 1984;15(1):11-8.
43. Flock A, Strelioff D. Graded and nonlinear mechanical properties of sensory hairs in the mammalian hearing organ. *Nature*. 1984;310(5978):597-9.
44. Strelioff D, Flock A. Stiffness of sensory-cell hair bundles in the isolated guinea pig cochlea. *Hear Res*. 1984;15(1):19-28.
45. Strelioff D, Flock A, Minser KE. Role of inner and outer hair cells in mechanical frequency selectivity of the cochlea. *Hear Res*. 1985;18(2):169-75.

46. Spoendlin H. [Anatomical and pathological aspects of the electrical stimulation of the deaf inner ear (author's transl)]. *Arch Otorhinolaryngol*. 1979;223(1):1-75.
47. Spoendlin H. Neural connections of the outer haircell system. *Acta Otolaryngol*. 1979;87(3-4):381-7.
48. Spoendlin H. Sensory neural organization of the cochlea. *J Laryngol Otol*. 1979;93(9):853-77.
49. Spoendlin H, Schrott A. The spiral ganglion and the innervation of the human organ of Corti. *Acta Otolaryngol*. 1988;105(5-6):403-10.
50. Liberman MC. Single-neuron labeling in the cat auditory nerve. *Science*. 1982;216(4551):1239-41.
51. Liberman MC. The cochlear frequency map for the cat: labeling auditory-nerve fibers of known characteristic frequency. *J Acoust Soc Am*. 1982; 72(5):1441-9.
52. Yuan WX, Chen SR, Chen H, Pan HL. Stimulation of alpha(1)-adrenoceptors reduces glutamatergic synaptic input from primary afferents through GABA(A) receptors and T-type Ca(2+) channels. *Neuroscience*. 2009; 158(4): 1616-24.
53. Peng JF, Wu ZT, Wang YK, Yuan WJ, Sun T, Ni X, et al. GABAergic mechanism in the rostral ventrolateral medulla contributes to the hypotension of moxonidine. *Cardiovasc Res*. 2011;89(2):473-81.
54. Iasnetsov VV, Motin VG, Karsanova SK, Iasnetsov VV, Ivanov Iu V, Chel'naia NA. [Investigation into the vestibular protective properties of melatoninergic agents]. *Aviakosm Ekolog Med*. 2014;48(2):31-4.
55. Kemp DT. Otoacoustic emissions, their origin in cochlear function, and use. *British Medical Bulletin*. 2002;63:223-41.
56. Kemp DT. Evidence of mechanical nonlinearity and frequency selective wave amplification in the cochlea. *Arch Otorhinolaryngol*. 1979;224(1-2):37-45.
57. Kemp DT. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J Acoust Soc Am*. 1978;64(5):1386-91.
58. Lavigne-Rebillard M, Bagger-Sjoberg D. Development of the human stria vascularis. *Hear Res*. 1992;64(1):39-51.
59. Chan KH, Eelkema EA, Furman JM, Kamerer DB. Familial sensorineural hearing loss: a correlative study of audiologic, radiographic, and vestibular findings. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1991;100(8):620-5.
60. Mudry A, Tange RA. The vascularization of the human cochlea: its historical background. *Acta Otolaryngol Suppl*. 2009(561):3-16.

61. Mudry A. Hyrtl fissure: a historical thriller. *Otol Neurotol*. 2009;30(4):570-3.
62. Breschet G. (1836), *Recherches anatomiques et physiologiques sur l'organe de l'ouïe et sur l'audition dans l'homme et les animaux vertébrés*. 2. éd., à laquelle on a ajouté l'histoire du plexus nerveux du tympan, avec 13 planches gravées. ed. Paris: J.B. Baillière; 295 p., 13 leaves of plates p.
63. Nabeya D. A study in the comparative anatomy of the blood-vascular system of the internal ear in Mammalia and Homo. *Acta Scholae Medicinalis, Kyoto University*. 1923;6: 1-132.
64. Smith CA. Capillary areas of the cochlea in the guinea pig. *Laryngoscope*. 1951;61(11):1073-95.
65. Charachon R. (1961), *Anatomie de l'artère auditive interne chez l'homme*. Impr. Bosc frères.
66. Axelsson A, Nuttall AL, Miller JM. Observations of cochlear microcirculation using intravital microscopy. *Acta Otolaryngol*. 1990;109(3-4):263-70.
67. Axelsson A, Ernstson S. Cochlear vascular anatomy in a strain of the waltzing guinea pig. *Acta Otolaryngol*. 1972;74(3):172-82.
68. Axelsson A. Comparative anatomy of cochlear blood vessels. *Am J Otolaryngol*. 1988;9(6):278-90.
69. Axelsson A. The demonstration of the cochlear vessels in the guinea pig by contrast injection. *J Laryngol Otol*. 1972;86(2):121-8.
70. Axelsson A. The vascular anatomy of the cochlea in the guinea pig and in man. *Acta Otolaryngol*. 1968:Suppl 243:3+.
71. Axelsson A, Vertes D. Vascular histology of the guinea pig cochlea. *Acta Otolaryngol*. 1978;85(3-4):198-212.
72. Axelsson A. The cochlear blood vessels in guinea pigs of different ages. *Acta Otolaryngol*. 1971;72(3):172-81.
73. Axelsson A. The vascular anatomy of the rhesus monkey cochlea. *Acta Otolaryngol*. 1974;77(6):381-92.
74. Ryan AF, Axelsson A, Myers R, Woolf NK. Changes in cochlear blood flow during acoustic stimulation as determined by <sup>14</sup>C-iodoantipyrine autoradiography. *Acta Otolaryngol*. 1988;105(3-4):232-41.
75. Nakai Y, Masutani H, Sugita M, Moriguchi M, Matsunaga M. Inner ear microvasculature in normal and experimental hydrops. A scanning electron microscopic study. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1991;481:125-8.
76. Hawkins JE, Jr. Microcirculation in the labyrinth. *Arch Otorhinolaryngol*. 1976;212(4):241-51.

77. Miodonski AJ, Gorczyca J, Nowogrodzka-Zagorska M, Litwin JA, Skladzien J. Microvascular system of the human fetal inner ear: a scanning electron microscopic study of corrosion casts. *Scanning Microsc.* 1993;7(2):585-94; discussion 94-5.
78. Murakami T, Itoshima T, Hitomi K, Ohtsuka A, Jones AL. A monomeric methyl and hydroxypropyl methacrylate injection medium and its utility in casting blood capillaries and liver bile canaliculi for scanning electron microscopy. *Arch Histol Jpn.* 1984;47(2):223-37.
79. Von Békésy G, Lempert J. Method for collecting samples of endolymph from the vestibular canal without contamination. *AMA Arch Otolaryngol.* 1958;68(1):33-6.
80. Von Békésy G. Similarities between hearing and skin sensations. *Psychological Review.* 1959;66(1):1-22.
81. Europa C. U.E. 86/609/CEE (1986), *As disposições legislativas, regulamentares, e administrativas dos Estados-membros respeitantes à protecção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos.*
82. U.E. DIRECTIVA 2010/63/UE (2010) *Europa PEeCd: Jornal Oficial da União Europeia*; p. 276/9.
83. Goyri-O'Neill JE. (1984), *Vascularização Placenta Humana*. Medical science Faculty: New University Of Lisbon.
84. Chevance LG. [Comparative Study of the Decalcification of Bone Structures of the Otic Capsule and Ossicles with the Aid of Ordinary Acid Solutions and a Chelator: Ethylenediaminetetraacetic Acid]. *Annales d'histochimie.* 1963;8:443-51.
85. Gussen R, Donahue D. Decalcification of Temporal Bones with Tetrasodium Edetate. *Arch Otolaryngol.* 1965;82:110-4.
86. Chole RA, Charpied GL. Preparation of small temporal bones for high-resolution light microscopy. *Arch Otolaryngol.* 1981;107(10):610-2.
87. Kappelmann RB, Prazma J, Pillsbury HC, 3rd. Comparative morphometric analysis of cochlear vessels in Wistar-Kyoto rats, spontaneously hypertensive rats, and aged spontaneously hypertensive rats. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1987;97(6):522-8.
88. Madden VJ, Henson MM. Rapid decalcification of temporal bones with preservation of ultrastructure. *Hear Res.* 1997;111(1-2):76-84.
89. Kimura Y, Kubo S, Koda H, Shigemoto K, Sawabe M, Kitamura K. RNA analysis of inner ear cells from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) archival

- human temporal bone section using laser microdissection — a technical report. *Hear Res.* 2013;302:26-31.
90. Moodycliffe M. A study of six decalcifying solutions. *Canadian journal of medical technology.* 1960;22:87-91.
  91. Perez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, Gonzalez-Rodriguez MP, Martin-Peinado FJ, Gonzalez-Lopez S. Decalcifying effect of 15% EDTA, 15% citric acid, 5% phosphoric acid and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. *Int Endod J.* 2008;41(5):418-23.
  92. Ferrer-Luque CM, Perez-Heredia M, Baca P, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP. Decalcifying effects of antimicrobial irrigating solutions on root canal dentin. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal.* 2013;18(1):e158-61.
  93. Prasad PD, M. A comparative study of various decalcification techniques. *Indian J Dent Res* 2013;24((3)):302-8.
  94. Goyri-O'Neill JE. (1984), *Técnica de plastinização — sua contribuição no ensino e investigação em anatomia.* Medical Science Faculty: New University Of Lisbon.
  95. Goyri-O'Neill JE., von Hagens, G.; Esperanca-Pina, J.A. (1982) *Modificações a técnica de diafanização. V International Symposium on Morphological Sciences;* Rio Janeiro Brasil.
  96. Kiernan J. (2008) *Histological and Histochemical Methods. Theory and Practice.* Scion Publishing Ltd.
  97. Von Békésy G. (1968), *Problems relating psychological and electrophysiological observations in sensory perception.* Perspectives in biology and medicine. 11(2):179-94.
  98. Lametschwandtner A, Lametschwandtner U, Weiger T. Scanning electron microscopy of vascular corrosion casts — technique and applications. *Scan Electron Microsc.* 1984(Pt 2):663-95.
  99. Correia MO. (1984), *Vascularização Arterial do Rim.* New University of Lisbon.
  100. Pais D. (1995), *Vascularização Arterial e Microvascularização Testículo-Epididimária.* New University of Lisbon.
  101. Goyri-O'Neill J, Pais D, Freire de Andrade F, Ribeiro P, Belo A, O'Neill A, et al. Improvement of the embalming perfusion method: the innovation and the results by light and scanning electron microscopy. *Acta Med Port.* 2013;26(3):188-94.
  102. Esperança-Pina JAP, D. As técnicas de obtenção de moldes vasculares por injeção para estudos macro e microvasculares dos diversos órgãos e tecidos.

- III parte: Técnica de moldes microvasculares para microscopia electrónica de varrimento. *Anais Portuguese de Medicina* 1998;III(2-3):33-40.
103. Bettencourt Pires MA. (2009), *Vascularização do útero: estudo morfológico e experimental*. New University of Lisbon.
  104. Pais DE-P, J.A. As técnicas de obtenção de moldes vasculares por injeção para estudos macro e microvasculares dos diversos Órgãos e tecidos. I parte: aspectos gerais na preparação de moldes vasculares. *Anais Portugueses de Medicina* 1997; II(374):121-6.
  105. Guedes-Silva JLC. (2012), *Efeitos da Laqueação Proximal dos Vasos Curtos e da Fundoplicatura Total sobre a Microcirculação da Fundo Gástrico*; Estudo Microvascular em Cobaias. New University of Lisbon.
  106. Esperança Pina J. A. Anatomia Humana do Coração e Vasos, 2.<sup>a</sup> edição Lidel 2007;375-376.
  107. Lametschwandtner A, Lametschwandtner U, Weiger T. Scanning electron microscopy of vascular corrosion casts-technique and applications: updated review. *Scanning Microsc.* 1990;4(4):889-940; discussion 1.
  108. Donoghue LT, JG. ; Steffes, CP; Wilson, RF. Vascular endothelial growth factor modulates contractile response in microvascular lung pericytes. *Am J Surg.* 2006 191:349-52.
  109. Kawamura H, Kobayashi M, Li Q, Yamanishi S, Katsumura K, Minami M, et al. Effects of angiotensin II on the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. *J Physiol.* 2004;561(Pt 3):671-83.
  110. Yamanishi S, Katsumura K, Kobayashi T, Puro DG. Extracellular lactate as a dynamic vasoactive signal in the rat retinal microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290(3):H925-34.
  111. Shi X, Han W, Yamamoto H, Tang W, Lin X, Xiu R, et al. The cochlear pericytes. *Microcirculation.* 2008;15(6):515-29.
  112. Dai M, Nuttall A, Yang Y, Shi X. Visualization and contractile activity of cochlear pericytes in the capillaries of the spiral ligament. *Hear Res.* 2009;254(1-2):100-7.
  113. Bernardes A. *Vascularização arterial do colon sigmoideu e do recto- Estudo anatomico-cirurgico e experimental*. Coimbra: Coimbra University; 1996.
  114. Penha R, O'Neill MA, Goyri O'Neill J, Esperanca Pina JA. Ultrastructural aspects of the microvasculature of the cochlea: the internal spiral network. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999;120(5):725-9.
  115. Esperança-Pina, J. A., Anatomia Humana da Relação, 4.<sup>a</sup> Edição Lidel 2009;425-443.



